

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UTILIZAÇÃO DE MURGANHOS NO ESTUDO DE NOVOS ALVOS DA TERAPIA
ONCOLÓGICA ANTI-ANGIOGÉNICA

Catarina Isabel Cruz de Carvalho

Orientador: Professor Doutor António José de Freitas Duarte

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na
Especialidade de Ciências Biológicas e Biomédicas

Júri:

Presidente: Professor Doutor Rui Manuel de Vasconcelos e Horta Caldeira

Vogais:

- Professor Doutor José António Henriques de Conde Belo
- Professora Doutora Paula Alexandra Martins de Oliveira
- Professor Doutor António José de Freitas Duarte
- Professor Doutor Sérgio Jerónimo Rodrigues Dias
- Professor Doutor Fernando António da Costa Ferreira

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UTILIZAÇÃO DE MURGANHOS NO ESTUDO DE NOVOS ALVOS DA TERAPIA
ONCOLÓGICA ANTI-ANGIOGÉNICA

Catarina Isabel Cruz de Carvalho

Orientador: Professor Doutor António José de Freitas Duarte

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na
Especialidade de Ciências Biológicas e Biomédicas

Júri:

Presidente: Professor Doutor Rui Manuel de Vasconcelos e Horta Caldeira

Vogais:

- Professor Doutor José António Henriques de Conde Belo
- Professora Doutora Paula Alexandra Martins de Oliveira
- Professor Doutor António José de Freitas Duarte
- Professor Doutor Sérgio Jerónimo Rodrigues Dias
- Professor Doutor Fernando António da Costa Ferreira

À Inês, que me iluminou desde o primeiro batimento

AGRADECIMENTOS

O caminho foi longo. Não direi que foi longo demais porque tudo leva o tempo que precisa de levar. Assim estava destinado. Cresci não só profissionalmente, mas também pessoalmente e acredito que as contrariedades encontradas fizeram de mim uma pessoa mais forte, determinada e preparada para o futuro. Muitas foram as pessoas que me acompanharam neste percurso e a todas elas quero aqui prestar o meu profundo agradecimento.

Ao professor António Freitas Duarte, foi ele que me desafiou a embarcar nesta viagem para alargar os horizontes do conhecimento. Com ele aprendi, discuti, partilhei a bancada e sem ele esta tese não seria levada a bom porto.

Ao Doutor Alexandre Trindade e à Doutora Ana Teresa Tavares por toda a experiência partilhada e conhecimentos transmitidos. Foram um farol nos dias mais sombrios.

A todas as minhas colegas de laboratório, à Joana, à Marina, à Rita, à Carina, à Liliana, todo o apoio, amizade e colaboração.

A todos os colegas do CIISA, mas especialmente à Doutora Elisabete Silva, ao Doutor Daniel Murta, Marta Baptista e Sofia Henriques, que acompanharam o meu percurso e que estiveram sempre disponíveis quando eu precisava.

Aos meus pais que, quer eu me saísse mal quer eu me saísse bem, só querem que seja feliz.

Ao Miguel, o meu companheiro, namorado, amigo e pai da minha filha, obrigada não só por todo o apoio, compreensão, por me ouvires e aconselhares quando eu me sentia perdida, mas também por me teres dado o milagre da vida que me iluminou e acompanhou na escrita desta tese.

FINANCIAMENTO

Agradeço à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) o financiamento da minha bolsa de doutoramento (SFRH/BD/44237/2008) e o financiamento concedido aos projetos em que participei: PTDC/SAU-ONC/121742/2010 e PTDC/CVT/115703/2009.

Agradeço também ao Centro Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) e à Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, por terem proporcionado as condições de acolhimento para desenvolver todo o trabalho experimental.



TÍTULO DA TESE: Utilização de murganhos no estudo de novos alvos da terapia oncológica anti-angiogénica.

RESUMO: A angiogénese é um dos marcos do desenvolvimento tumoral, sendo fundamental para o crescimento do tumor primário e para a metastização. A terapia oncológica anti-angiogénica surgiu como uma estratégia promissora. Contudo, o aparecimento de tumores que não são sensíveis, o desenvolvimento de resistência e a controvérsia sobre o impacto na metastização, tem suscitado apreensão na utilização desta abordagem terapêutica. Importa por isso esclarecer qual o impacto da anti-angiogénese na metastização e desenvolver novas abordagens terapêuticas anti-angiogénicas ou melhorar as existentes, identificando a melhor fase da progressão tumoral para intervir.

Recentemente a terapia anti-Dll4 foi confirmada como uma ferramenta viável na luta contra o cancro. Todavia, importa ainda esclarecer o seu efeito no aporte tumoral de fármacos citostáticos e no processo metastático, o que permitirá consolidar a validação deste ligando como um alvo terapêutico útil e promissor.

Compreender melhor os mecanismos moleculares implicados no desenvolvimento vascular embrionário permitirá a identificação de novos alvos terapêuticos. A Tspan18, uma molécula ainda pouco estudada, parece desempenhar funções pró-angiogénicas, mas o seu papel na angiogénese mamífera ainda não foi elucidado.

Utilizando um modelo murino transgénico de adenocarcinoma prostático, o TRAMP, verificámos que a combinação de uma terapia anti-angiogénica, o sDll4Fc, com um citostático, a doxorrubicina, conduziu a uma marcada redução do volume tumoral melhorando simultaneamente a concentração do citostático no estroma tumoral. O modelo de metastização experimental com células de melanoma murino B16-F10 permitiu-nos verificar uma redução do número de focos metastáticos pulmonares nos murganhos heterozigóticos para *Dll4* especificamente no endotélio. A produção de uma nova linha de murganhos com perda-de-função condicional e induzível da Tspan18 não foi possível, pelo que não conseguimos investigar o papel desta molécula na angiogénese.

Palavras-chave: anti-angiogénese, cancro, Dll4, Tspan18, murganhos.

TITLE OF THE THESIS: Use of mice in the study of new targets for anti-angiogenic cancer therapy.

ABSTRACT: Angiogenesis is one of the hallmarks of cancer fundamental to primary tumor growth and metastization. Cancer therapy with anti-angiogenic agents has emerged as a promising approach. However, some tumors are not sensitive and others are resistant. Additionally, there is still controversy about the impact of anti-angiogenesis in metastization. Therefore, it urges to elucidate the effect of anti-angiogenics in metastatic progression, develop new anti-angiogenics or improve existing ones and point which is the best therapeutical window.

Recently, anti-Dll4 therapy has been confirmed as a viable tool in the fight against cancer. Still to be elucidated is its effect in the delivery of systemically administered anticancer therapies and in invasion and metastasis, which will allow its validation as useful and promising therapeutical target.

Understanding the molecular mechanisms underlying vascular development will allow the discovery of new therapeutic targets. Tetraspanin 18, a still largely unknown transmembrane protein, seems to have pro-angiogenic properties, however its role in mammalian angiogenesis is still to be elucidated.

Using a transgenic murine model of prostate adenocarcinoma, TRAMP, we have found that the combined systemic administration of sDll4Fc and doxorubicin resulted in a dramatic reduction of the tumor volume while substantially improving the delivery of the cytostatic. The experimental metastasis model with the murine melanoma cell line B16-F10, allowed us to observe a reduction of the number of lung metastatic foci in endothelial heterozygous Dll4 mice. The production of a new mutant mouse line with conditional and inducible Tspan18 loss of function, was not possible, therefore we were unable to investigate the role of this molecule in angiogenesis.

Keywords: anti-angiogenesis, cancer, Dll4, Tspan18, mice.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. A vasculatura tumoral como alvo terapêutico.....	9
2.1.1. Angiogénese tumoral.....	9
2.1.2. Principais abordagens terapêuticas.....	16
2.1.2.1. Terapia anti-VEGF.....	21
2.1.2.1.1. Via de sinalização VEGF.....	21
2.1.2.1.2. Inibidores da sinalização VEGF.....	27
2.1.2.2. Terapia anti-Notch.....	30
2.1.2.2.1. Via de sinalização Notch.....	30
2.1.2.2.2. Papel da via de sinalização Notch na progressão tumoral.....	39
2.1.2.2.3. Inibidores da via Notch.....	46
2.1.3. Desvantagens.....	51
2.1.3.1. Desenvolvimento de resistência.....	51
2.1.3.2. Efeitos pró-invasivos/metastáticos.....	55
2.1.3.3. Efeitos adversos.....	62
2.2. Tetraspanins.....	67
2.2.1. Tetraspanins na biologia vascular.....	71
2.2.2. Tetraspanins na biologia tumoral.....	76
2.2.3. Tetraspanin18.....	82
2.2.3.1. Localização.....	82
2.2.3.2. Expressão conhecida.....	82
2.3. O murganho como modelo experimental.....	84
2.3.1. Princípios da utilização de modelos animais.....	84
2.3.1.1. O conceito de modelo animal. Tipos de modelos animais.....	84
2.3.1.2. Extrapolação.....	85
2.3.1.3. A seleção de modelos animais.....	86
2.3.2. O murganho – <i>Mus musculus</i>	86
2.3.2.1. O ratinho na investigação biomédica.....	87
2.3.2.2. Vantagens/razões para a utilização do murganho como modelo.....	88
2.3.3. Manipulação genética.....	90
2.3.3.1. Células estaminais embrionárias.....	91
2.3.3.2. Recombinação homóloga.....	92
2.3.3.3. Sistemas de recombinação sítio-específica.....	93
2.3.3.4. Sistemas de recombinação induzível.....	97
2.3.4. Modelos tumorais.....	100
2.3.4.1. Transplantes tumorais.....	101
2.3.4.2. Modelos murinos geneticamente modificados.....	104
2.3.4.3. Modelos autóctones.....	107
2.3.5. Modelos de metastização.....	108
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	118
3.1. Delineamento experimental.....	118
3.1.1. Avaliação da eficácia da combinação Dll4Fc-doxorrubicina no tratamento do adenocarcinoma prostático – trabalho experimental I.....	118

3.1.2. Estabelecimento de um modelo murino de metastização para o estudo da função endotelial do ligando Dll4 no processo metastático – trabalho experimental II.....	118
3.1.3. Produção de uma nova linha de murganhos com perda-de-função condicional e induzível da Tetraspanin18 – trabalho experimental III	120
3.2. Murganhos	120
3.2.1. TRAMP	120
3.2.2. C57BL/6	122
3.2.3. CD-1 e NMRI	122
3.2.4. <i>VE-cadherin-Cre-ER^{T2}</i> e <i>CAGG-Cre-ERTM</i>	122
3.2.5. <i>Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre-ER^{T2}</i>	123
3.3. Procedimentos e reagentes específicos do trabalho experimental I.....	123
3.3.1. sDll4Fc	123
3.3.2. Doxorrubicina	124
3.3.3. Recolha e processamento dos tumores prostáticos	125
3.3.3.1. Recolha da próstata e avaliação do crescimento tumoral	125
3.3.3.2. Processamento histológico dos tecidos para imunohistoquímica.....	126
3.3.3.3. Processamento histológico dos tecidos para imunofluorescência	126
3.3.3.4. Microtomia	126
3.3.4. Análise histológica	127
3.3.4.1. Preparação das secções de parafina	127
3.3.4.2. Imunohistoquímica	127
3.3.4.3. Preparação das crio-secções	128
3.3.4.4. Imunofluorescência indireta	128
3.3.4.5. Avaliação da perfusão e extravasação vascular	130
3.3.4.6. Microscopia	131
3.3.5. Análise quantitativa da transcrição genética	132
3.3.5.1. Processamento dos tecidos	132
3.3.5.2. Extração e quantificação do ARN	132
3.3.5.3. Transcrição reversa – síntese de ADNc	132
3.3.5.4. PCR em tempo real.....	133
3.3.6. Quantificação da doxorrubicina tumoral.....	134
3.3.6.1. Extração da doxorrubicina tumoral	134
3.3.6.2. Espectrofotometria	135
3.3.7. Citometria de fluxo	135
3.4. Procedimentos e reagentes específicos do trabalho experimental II	136
3.4.1. Células de melanoma murino B16-F10.....	136
3.4.1.1. Cultura <i>in vitro</i> e criopreservação	137
3.4.1.2. Preparação da suspensão celular para inoculação	139
3.4.2. Modelo de metastização espontânea	139
3.4.2.1. Preparação dos murganhos para a implantação subcutânea e intradérmica	140
3.4.2.2. Monitorização do crescimento do tumor primário	141
3.4.2.3. Cirurgia para remoção do tumor primário.....	141
3.4.3. Modelo de metastização experimental	143
3.4.3.1. Genotipagens para <i>Dll4^{lox/wt}</i> e para <i>VE-cadherin-Cre-ER^{T2}</i>	143
3.4.3.2. Administração de tamoxifeno	143
3.4.3.3. Preparação dos murganhos para administração endovenosa.....	144
3.4.3.4. Administração endovenosa na veia lateral da cauda	144
3.4.4. Recolha dos pulmões e linfonodos.....	145
3.4.4.1. Contagem do número de focos metastáticos	145
3.5. Procedimentos e reagentes específicos do trabalho experimental III	146
3.5.1. Vetor Tspan18cKO	146

3.5.1.1. Transformação de células competentes	150
3.5.1.2. Amplificação e extração de ADN plasmídico em pequena escala	151
3.5.1.3. Extração de ADN plasmídico em grande escala.....	152
3.5.1.4. Digestões de diagnóstico com endonucleases de restrição	153
3.5.1.5. Sequenciação	154
3.5.1.6. Testagem da funcionalidade dos locais <i>loxP</i>	155
3.5.1.6.1. Produção de bactérias <i>Escherichia coli</i> BNN132 competentes	155
3.5.1.6.2. Transformação de bactérias <i>E. coli</i> BNN132 competentes.....	155
3.5.1.6.3. Amplificação e extração em pequena escala do ADN plasmídico recombinado	156
3.5.1.6.4. Linearização com endonuclease de restrição	156
3.5.1.6.5. Electroforese em gel de agarose e confirmação da funcionalidade dos locais <i>loxP</i>	156
3.5.1.7. Linearização e purificação para eletroporação	157
3.5.2. Células estaminais embrionárias	158
3.5.3. Cultura e manutenção de células estaminais embrionárias de murgancho da linha R1 (<i>agouti</i>).	158
3.5.3.1. Tratamento das culturas de fibroblastos embrionários primários com mitomicina-C.	159
3.5.3.2. Gelatinização de placas.....	160
3.5.3.3. Preparação de <i>feeder layers</i>	160
3.5.3.4. Produção de <i>Leukemia Inhibitory Factor</i> (LIF).....	161
3.5.3.5. Descongelamento das CEEs.....	163
3.5.3.6. Passagem das CEEs	163
3.5.4. Eletroporação do ADN plasmídico linearizado nas CEEs	165
3.5.5. Seleção de colónias de CEEs resistentes a Geneticina® (G418) e Ganciclovir..	166
3.5.5.1. Isolamento dos clones resistentes	166
3.5.5.2. Passagem das células estaminais em placas de 96 poços	167
3.5.5.3. Congelamento das CEEs em placas de 96 poços	168
3.5.5.4. Extração do ADN genómico em placas de 96 poços.....	168
3.5.6. Seleção dos clones recombinantes por PCR.....	169
3.5.7. Passagem e congelamento dos clones de CEEs recombinantes homólogos.....	171
3.5.7.1. Descongelamento da placa de 96 poços	171
3.5.7.2. Passagem e amplificação dos clones recombinantes	172
3.5.7.3. Congelamento dos clones de CEEs recombinantes homólogos em criotubos	172
3.5.8. Preparação das CEEs para agregação	173
3.5.9. Indução de superovulação	174
3.5.10. Colheita de embriões no estágio de mórula de oito células.....	176
3.5.11. Agregação das mórulas de oito células com CEEs recombinantes homólogos	178
3.5.11.1. Preparação da placa de agregação.....	178
3.5.11.2. Remoção da zona pelúcida às mórulas	178
3.5.11.3. Montagem das agregações	179
3.5.11.4. Recolha dos embriões agregados	181
3.5.12. Obtenção de fêmeas de murgancho pseudogestantes.....	181
3.5.13. Vasectomização de murganchos da estirpe CD-1	182
3.5.14. Transferência uterina dos embriões agregados.....	183
3.5.15. Análise das quimeras	185
3.5.16. Determinação da contribuição das CEEs recombinantes nas células da linha germinativa das quimeras.....	187
3.5.17. Confirmação da introdução da mutação nos descendentes <i>agouti</i> (F1)	188
3.5.18. Cruzamentos dos descendentes F1 <i>agouti</i> (Tsp18 ^{lox/wt}).....	188
3.5.18.1. Genotipagem dos descendentes F2	189

3.5.19. Cruzamentos dos descendentes F2 entre si	190
3.5.19.1. Genotipagem dos descendentes F3	190
3.5.20. Sequenciação do braço esquerdo de homologia.....	192
3.5.20.1. Sequenciação direta do produto de PCR	193
3.5.20.2. Clonagem e sequenciação do produto de PCR da região a jusante do 1º loxP.....	193
3.6. Procedimentos e reagentes comuns aos trabalhos experimentais II e III.....	195
3.6.1. Extração de ADN da cauda	195
3.6.2. Eletroforese em géis de agarose	195
3.7. Análise estatística	195
4. RESULTADOS	197
4.1. Avaliação da eficácia da combinação Dll4Fc-doxorrubicina no tratamento do adenocarcinoma prostático.....	197
4.1.1. Dll4 é expresso na vasculatura e células epiteliais da próstata e sobre-expresso nas células epiteliais dos tumores prostáticos de murganhos TRAMP	197
4.1.2. A terapia com sDll4Fc administrada numa fase precoce do desenvolvimento inibe o crescimento tumoral prostático.....	198
4.1.3. sDll4Fc é mais eficaz na redução do crescimento tumoral prostático quando administrado numa fase tardia do desenvolvimento tumoral	201
4.1.4. A administração combinada de sDll4Fc e doxorrubicina impede o crescimento tumoral.....	204
4.1.5. A terapia com sDll4Fc promove uma neo-vascularização não-funcional mas aumenta a disponibilidade dos fármacos no tumor.....	207
4.1.6. A terapia combinada com sDll4Fc potencia o efeito imunomodulador tumoricida da doxorrubicina.....	208
4.2. Estabelecimento de um modelo murino de metastização para o estudo da função endotelial do ligando Dll4 no processo metastático.....	210
4.2.1. Transplantes singénicos subcutâneos	210
4.2.2. Transplantes singénicos ortotópicos (intradérmicos).....	214
4.2.3. Modelo de metastização experimental	216
4.2.3.1. O número de metástases pulmonares é semelhante entre machos e fêmeas	216
4.2.3.2. A perda-de-função do ligando Dll4 ao nível do endotélio conduz a um número significativamente inferior de macrometástases pulmonares	217
4.3. Produção de uma nova linha de murganhos com perda-de-função condicional e induzível da Tetraspanin18	220
4.3.1. Vetor.....	220
4.3.2. Eletroporação	224
4.3.3. Clones de células estaminais embrionárias recombinantes.....	227
4.3.4. Superovulação e colheita de embriões	229
4.3.5. Agregação	231
4.3.5.1. Por estirpe dadora de embriões	233
4.3.5.2. Por clone de CEEs recombinante	234
4.3.6. Transferência uterina.....	235
4.3.6.1. Pseugestação.....	235
4.3.6.2. Sucesso por estirpe recetora	236
4.3.6.3. Sucesso por técnica	237
4.3.7. Quimeras	239
4.3.7.1. Grau de quimerismo por avaliação da coloração da pelagem	240
4.3.7.2. Contribuição para as células da linha germinativa	242
4.3.8. Genotipagem	243
4.3.8.1. Dos descendentes F1	243

4.3.8.2. Dos descendentes F2.....	245
4.3.8.3. Dos descendentes F3.....	248
4.3.9. Sequenciação do braço esquerdo de homologia – ausência do primeiro <i>loxP</i> nas quimeras com transmissão à descendência.....	251
5. DISCUSSÃO	253
6. CONCLUSÕES GERAIS	275
BIBLIOGRAFIA	278
ANEXO I	337
ANEXO II.....	343
ANEXO III.....	345
ANEXO IV	346
ANEXO V.....	349
ANEXO VI	350

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Papel da angiogénese tumoral no local primário e metastático	10
Figura 2 - Os vasos tumorais são estrutural e funcionalmente anormais.	14
Figura 3 - Terapia anti-angiogénica baseada na normalização vascular.	19
Figura 4 - Representação esquemática da via de sinalização Notch	31
Figura 5 - A sinalização Dll4/Notch atua a jusante da sinalização VEGF para prevenir a angiogénese excessiva e desencadear a diferenciação terminal dos vasos recém-formados.....	37
Figura 6 - A sinalização Dll4/Notch controla a densidade da rede vascular e a maturação dos vasos tumorais	42
Figura 7 - Efeito do bloqueio da sinalização Dll4/Notch na angiogénese tumoral	47
Figura 8 - Respostas do hospedeiro induzidas pela terapia anti-angiogénica	54
Figura 9 - Características estruturais das tetraspanins	68
Figura 10 - Reações de recombinação catalisadas por Cre ou Flp	95
Figura 11 - Complexo sináptico formado entre moléculas de recombinase e dois locais alvo.....	96
Figura 12 - Sistema Cre- <i>loxP</i> induzível por tamoxifeno	99
Figura 13 - Tipos de modelos tumorais transplantados.....	100
Figura 14 - Representação esquemática do vetor Tspan18cKO	147
Figura 15 - Representação esquemática do vetor Tspan18cKO linearizado e integrado aleatoriamente ou por recombinação homóloga no ADN genómico	148
Figura 16 - Representação esquemática da integração do vetor Tspan18cKO por recombinação homóloga no ADN genómico, da excisão da sequência entre locais FRT após expressão da recombinase Flp e da subsequente excisão da sequência entre o 1º e 2º locais <i>loxP</i> por indução da expressão da recombinase Cre.....	148
Figura 17 - Representação esquemática da integração do vetor Tspan18cKO por recombinação homóloga no ADN genómico e da subsequente excisão da sequência entre o 1º e 2º locais <i>loxP</i> , entre o 2º e o 3º locais <i>loxP</i> ou entre o 1º e o 3º locais <i>loxP</i> por indução da expressão da recombinase Cre.....	149
Figura 18 - Representação esquemática dos locais de hibridação das sequências iniciadoras utilizadas para detetar a ocorrência de recombinação homóloga com o braço direito de homologia.....	170
Figura 19 - Representação esquemática dos locais de hibridação das sequências iniciadoras utilizadas para detectar a ocorrência de recombinação homóloga com o braço esquerdo de homologia	171
Figura 20 - Representação esquemática do ovário, oviducto e útero.....	177
Figura 21 - Representação esquemática da placa de agregação	178
Figura 22 - Depressão da placa de agregação com uma mórula e um agregado de células estaminais embrionárias R1 lado a lado.....	180
Figura 23 - Representação esquemática da pipeta de transferência já montada.....	184
Figura 24 - Representação esquemática dos locais de hibridação das sequências iniciadoras usadas no PCR Tsp18HOMO.....	191
Figura 25 - Representação esquemática do local de hibridação das sequências iniciadoras usadas no PCR Tsp18LoxI3.....	192
Figura 26 - Dll4 encontra-se nas células endoteliais e epiteliais da próstata normal mas é sobre-expresso na próstata tumoral de murganhos TRAMP	197
Figura 27 - A monoterapia com sDll4Fc entre as semanas 12 e 18 é eficaz na redução do crescimento tumoral prostático de murganhos TRAMP por afetar a neoangiogénese tumoral.....	199

Figura 28 - A monoterapia com sDll4Fc entre as semanas 18 e 24 é mais eficaz na redução do crescimento tumoral prostático de murganhos TRAMP do que a monoterapia de intervenção precoce (entre as semanas 12 e 18).....	202
Figura 29 - A terapia com sDll4Fc e doxorubicina entre as semanas 18 e 24 consegue anular quase totalmente o crescimento tumoral prostático nos murganhos TRAMP.....	205
Figura 30 - A administração combinada de sDll4Fc e doxorubicina aumenta a concentração de doxorubicina no meio tumoral.....	207
Figura 31 - A administração combinada de sDll4Fc e doxorubicina potencia um aumento das células granulocíticas/monocíticas que medeiam a função da doxorubicina.....	209
Figura 32 - Aspeto do tumor primário 15 dias após implantação intradérmica de 3×10^4 células B16-F10 num murganho C57BL/6.....	214
Figura 33 - Modelo de metastização experimental em murganhos C57BL/6.....	217
Figura 34 - A administração de tamoxifeno leva ao desenvolvimento de menos macrometástases pulmonares nos murganhos fêmea.....	218
Figura 35 - Modelo de metastização experimental em murganhos transgênicos $Dll4^{lox/wt}$ - <i>VE-cadherin-Cre-ER^{T2}</i>	219
Figura 36 - Linearização do vetor Tsp18cKO.....	220
Figura 37 - Restrições de diagnóstico do vetor Tspan18cKO.....	221
Figura 38 - Testagem da funcionalidade dos locais <i>loxP</i>	222
Figura 39 - PCR Tsp18RA.....	228
Figura 40 - PCR Tsp18LA.....	229
Figura 41 - Taxa de gestação.....	230
Figura 42 - Eficiência da superovulação.....	230
Figura 43 - Rendimento de embriões por estirpe de murganho.....	231
Figura 44 - Sucesso da agregação ao longo do tempo.....	233
Figura 45 - Sucesso da agregação por estirpe dadora de embriões.....	234
Figura 46 - Sucesso da agregação por clone de CEE recombinante.....	235
Figura 47 - Pseudoplugs.....	236
Figura 48 - Sucesso das transferências por estirpe recetora.....	237
Figura 49 - Sucesso das transferências por técnica.....	238
Figura 50 - Fotografias das doze quimeras obtidas.....	242
Figura 51 - Genotipagem dos descendentes F1.....	244
Figura 52 - Genotipagem de confirmação dos descendentes F1.....	245
Figura 53 - Genotipagem dos descendentes F2 para Tsp18 ^{lox}	246
Figura 54 - Genotipagem dos descendentes F2 Tsp18 ^{lox/wt} para <i>CAG-Cre</i>	247
Figura 55 - Genotipagem dos descendentes F2 Tsp18 ^{lox/wt} para <i>VE-Cad-Cre</i>	247
Figura 56 - Genotipagem dos descendentes F3 com o PCR Tsp18HOMO.....	248
Figura 57 - Genotipagem dos descendentes F3 com o PCR Tsp18LoxI3.....	249
Figura 58 - Genotipagem das quimeras fundadoras com o PCR Tsp18LoxI3.....	250
Figura 59 - Genotipagem das quimeras sem descendência <i>agouti</i> com o PCR Tsp18LoxI3.....	251
Figura 60 - Confirmação da ausência do local <i>loxP</i> do intrão 3 por sequenciação.....	252

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Modelo de metastização espontânea por implantação subcutânea.....	212
Tabela 2 - Volume tumoral (em mm ³) de cada animal intervencionado cirurgicamente em cada ensaio de metastização espontânea por implantação subcutânea de células B16-F10.	212
Tabela 3 - Modelo de metastização espontânea por implantação intradérmica.	215
Tabela 4 - Volume tumoral (em mm ³) de cada animal intervencionado cirurgicamente em cada ensaio de metastização espontânea por implantação intradérmica de células B16-F10.	215
Tabela 5 - Amostras de ADN plasmídico do vetor Tsp18cKO.	223
Tabela 6 - Primeira sessão de eletroporação.	225
Tabela 7 - Segunda sessão de eletroporação.	226
Tabela 8 - Terceira sessão de eletroporação.	226
Tabela 9 - Sessões de agregação.....	232
Tabela 10 - Número de crias e quimeras obtidas por estirpe recetora nas 23 sessões de transferência uterina.	239
Tabela 11 - Número de crias e quimeras obtidas por clone de CEEs nas 23 sessões de transferência uterina.	240
Tabela 12 - Quimeras vivas.	241

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa – aminoácidos
AAs – Agentes anti-angiogénicos
ADN – Ácido desoxirribonucleico
ADNc – Ácido desoxirribonucleico complementar
 α -SMA – *alpha Smooth Muscle Actin*
a.m. – *ante meridiem*
Ang – Angiopoietina
ARN – Ácido ribonucleico
ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro
bFGF – *basic Fibroblast Growth Factor*
BSA – *Bovine Serum Albumin*
CAGG – *Citomegalovirus early enhancer/chicken β actin promoter*
CD – *Cluster of Differentiation*
CEEs – Células Estaminais Embrionárias
CEs – Células Endoteliais
cKO – *conditional KnockOut*
Cre-ER^{T2} – *Cre recombinase-tamoxifen receptor fusion protein*
CSCs – *Cancer Stem Cells*
CT – *Cycle Threshold*
CTDs – Células Tumerais Disseminadas
DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*
DBZ – dibenzazepina
Dll1 – *Delta-like 1*
Dll3 – *Delta-like 3*
Dll4 – *Delta-like 4*
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPBS – *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*
dpc – *days post coitum*
E – dia embrionário
E. coli – *Escherichia coli*
EC2 – ansa extracelular longa
EDTA – *EthyleneDiamine Tetraacetic Acid*
EGF – *Epidermal Growth Factor*
EMT – *Epithelial to Mesenchymal Transition*
eNOS – Sintase endotelial do Óxido Nítrico
EPCs – *Endothelial Progenitor Cells*
ER – *Estrogen Receptor*
ER- β – *Estrogen Receptor beta*
FDA – *Food and Drug Administration*
FIH – Fator de Inibição de HIFs
Flk1 – *Foetal liver kinase 1*
Flt1 – *Fms-like tyrosine kinase 1*
Flt4 – *Fms-like tyrosine kinase 4*
FRT – *Flippase Recognition Target*
GBM – glioblastoma multiforme
GEMMs – *Genetically Engineered Mouse Models*
GSI – *γ -secretase inhibitors*
hCG – *human Chorionic Gonadotropin*

Hes – *Hairy/Enhancer of Split*
 HGF – *Hepatocyte Growth Factor*
 HIF – *Hypoxia-Inducible Factor*
 HRE – *Hypoxia-Responsive Elements*
 HSPG – *Heparan Sulfate ProteoGlycan*
 HSV – *Herpes Simplex Virus*
 HUAEC – *Human Umbilical Artery Endothelial Cells*
 HUVEC – *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
 ICAM-1 – *Intracellular Adhesion Molecule 1*
 IGF – *Insulin like Growth Factor*
 IgG – *Imunoglobulina G*
 IHQ – *Imunohistoquímica*
 IMPC – *International Mouse Phenotyping Consortium*
 Jag-1 – *Jagged 1*
 Jag-2 – *Jagged 2*
 Kb – *kilo pares de bases*
 KDS – *dodecil sulfato potássio*
 KLF2 – *Krüppel-like factor 2*
 KO – *KnockOut*
 LIF – *Leukemia Inhibitory Factor*
 LLC – *Lewis Lung Carcinoma*
 loxP – *locus of X-over of P1*
 MAML1 – *mastermind-like 1*
 MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinase*
 MB – *Membrana Basal*
 MCS – *Multiple Cloning Site*
 MEC – *Matriz extracelular*
 Mib – *Mindbomb*
 MMP – *Matrix Metaloproteinase*
 MMTV – *Mouse Mammary Tumor Virus*
 MOPS – *3-Morpholinopropane-1-sulfonic acid*
 MT1-MMP – *Membrane Type 1-Matrix Metaloproteinase*
 mTOR – *mammalian Target Of Rapamycin*
 NECD – *Notch Extracellular Domain*
 NeoR – *Neomycin Resistance*
 Neu – *Neuralized*
 NICD – *Notch IntraCellular Domain*
 NK – *Natural Killer*
 NMRI – *Naval Medical Research Institute*
 NOD/SCID – *Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immune Deficiency*
 Nrarp – *Notch-regulated ankyrin repeat protein*
 Nrpl – *neuropilina 1*
 NTMD – *Notch Transmembrane Domain*
 O.D. – *Densidade Óptica*
 p – *nível de significância*
 p.m. – *post meridiem*
 pb – *pares de base*
 PBS – *Phosphate Buffer Saline*
 pBSII KS(+) – *pBluescript II KS(+)*
 PCR – *Polymerase Chain Reaction*
 PDGF – *Platelet Derived Growth Factor*
 PDGF-Rs – *Platelet Derived Growth Factor Receptors*

PDH2 – prolil-hidroxilase 2
 PECAM – *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*
 PFA – paraformaldeído
 PI3Ks – *Phosphoinositide 3 Kinases*
 PI4K – *Phosphoinositide 4 Kinase*
 PIN – *Prostatic intraepithelial neoplasia*
 PlexD1 – plexina D1
 PlGF – *Placental Growth Factor*
 PMSG – *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*
 RBPj – *Recombination signal sequence-Binding Protein for immunoglobulin- κ J*
 s.c. – subcutâneo
 SDF-1 – *Stromal Derived Factor 1*
 SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*
 SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
 Sema – *Semaphorin*
 Sema3-AB – *Semaphorin-3AB*
 SFB – Soro Fetal Bovino
 siRNA – *short interfering ribonucleic acid*
 SV40 – *Simian Virus 40*
 TACE – enzima conversora do fator de necrose tumoral α
 TEMs – *Tetraspanin-Enriched Microdomains*
 TGF- β – *Transforming Growth Factor β*
 TIMPs – *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*
 TIMP-1 – *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1*
 TK – *Tyrosine-Kinase*
 TKIs – *Tyrosine-Kinase Inhibitors*
 Tm – *Temperature of melting*
 TRAMP – *TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*
 TSGs – *Tumour-Suppressor Genes*
 Tsp-1 – Trombospondina-1
 Tspans – *Tetraspanins*
 Tspan18 – *Tetraspanin18*
 Tspan18cKO – *Tetraspanin18 conditional Knockout*
 Ub – ubiquitinização
 VDAs – agentes disruptores vasculares
 VE-Cad – *Vascular Endothelial Cadherin*
 VEGF – fator de crescimento endotelial vascular
 VEGF-R – recetor do fator de crescimento endotelial vascular
 VHL – von Hippel-Lindau
 VPF – *Vascular Permeability Factor*
 vSMCs – células de músculo liso vascular
 vWF – *Von Willebrand Factor*
 WT – *Wild Type*
 α -SMA – *alpha Smooth Muscle Actin*

1. INTRODUÇÃO

A angiogénese é um dos marcos do desenvolvimento tumoral, sendo um processo fundamental para o crescimento do tumor primário e para a metastização (J. Folkman, 1971, 2002; Zetter, 1998).

As terapias anti-angiogénicas têm lentamente ganho espaço na terapia oncológica, mostrando-se bastante promissoras como adjuvantes da quimioterapia convencional para ultrapassar algumas das limitações desta (Carmeliet & Jain, 2011b; Ebos & Kerbel, 2011; Ferrara & Kerbel, 2005).

Contudo, ainda pouco se sabe sobre como é que estes diferentes tipos de tratamento interatuam e cooperam para conduzir a um bloqueio do crescimento ou mesmo remissão dos tumores tratados. Importa também determinar o potencial das terapias anti-angiogénicas nas diversas fases da progressão tumoral para identificar o estágio patológico em que é mais eficaz intervir e para delinear as implicações mecanísticas.

Atualmente existem dez fármacos anti-angiogénicos aprovados para uso clínico em diferentes tipos de cancro (Rakesh K. Jain, 2014). No entanto, o aparecimento de tumores que não são sensíveis e de outros que desenvolvem resistência tem suscitado alguma apreensão na utilização desta abordagem terapêutica (Beijnum, Nowak-sliwinska, Huijbers, Thijssen, & Griffioen, 2015; Bergers & Hanahan, 2008).

Além disso, estudos recentes vieram revelar que a terapêutica anti-angiogénica dirigida ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*) pode paradoxalmente acelerar o processo metastático (Ebos et al., 2009; Pàez-Ribes et al., 2009). Todavia, outros autores publicaram observações contrárias (Sini et al., 2008; Verheul, Lolkema, et al., 2007).

A formação de metástases continua a representar um dos maiores desafios na luta contra o cancro. A metastização representa quase sempre a etapa final da progressão das neoplasias sólidas malignas e é a causa de mais de 90% de todas as mortes associadas ao cancro (Chaffer & Weinberg, 2011; Weinberg, 2014b).

Apesar de as abordagens terapêuticas convencionais como a cirurgia, radioterapia ou quimioterapia terem um efeito significativo no controlo da progressão do tumor primário, raramente conseguem controlar a progressão da doença metastática. Por isso, o processo metastático é atualmente um dos principais focos de investigação na área da oncologia. Dada a natureza complexa da metastização tumoral, a nossa compreensão sobre este processo é ainda limitada. Os mecanismos moleculares envolvidos em cada etapa só agora começam a ser melhor compreendidos, mas ainda há muito para esclarecer sobretudo nos fenómenos de sobrevivência na circulação sanguínea, tropismo tecidual, dormência e colonização evidente e sobre as

alterações genéticas e epigenéticas envolvidas. Para responder a todas estas questões, é importante usar modelos experimentais que consigam recapitular, pelo menos de um modo geral, as condições fisiológicas e patológicas que se verificam nos pacientes oncológicos.

Importa por isso utilizar modelos adequados para esclarecer se a anti-angiogénese de fato afeta a progressão metastática para assim desenvolver novas abordagens terapêuticas anti-angiogénicas ou melhorar as existentes.

A via de sinalização Notch influencia decisões de destino celular numa grande variedade de tecidos, entre os quais o tecido vascular em desenvolvimento e o tecido tumoral (Kopan, 2012). A ativação da sinalização Notch pode contribuir para a progressão tumoral através de diversos mecanismos. Esta via está envolvida na manutenção da capacidade de autorrenovação das células neoplásicas estaminais, contribuindo diretamente para processos celulares envolvidos na invasão tumoral (como a transição epitélio-mesenquimal em resposta à hipóxia) (Y. Wang, Liu, Malek, Zheng, & Liu, 2011); participa ainda no controlo da neovascularização e tem também um papel fundamental no estabelecimento do nicho metastático (Ntziachristos, Lim, Sage, & Aifantis, 2014).

Tendo em conta a sua participação em todos estes processos, a via de sinalização Notch emergiu como objeto de intensa investigação, uma vez que terapias dirigidas aos diferentes componentes da via podem permitir o desenvolvimento de novas terapias antitumorais (Gurney & Hoey, 2011).

Mediante a produção de ratinhos *knockout*, foi demonstrado que um dos ligandos desta via, o *Delta-like 4* (Dll4), é extremamente importante para a formação da árvore vascular e diferenciação arterial durante o desenvolvimento embrionário, apresentando uma gravidade fenotípica ligada ao número de alelos funcionais presentes (Duarte et al., 2004).

Durante o desenvolvimento, a heterozigotia para *Dll4* aumenta a sensibilidade das células endoteliais ao fator pró-angiogénico VEGF, provocando um aumento do número de células-ponta e da densidade vascular, mas reduzindo a perfusão e a funcionalidade dos vasos da retina e de estádios embrionários (Suchting et al., 2007).

Recentemente a terapia anti-Dll4 foi confirmada como uma ferramenta viável na luta contra o cancro (Kuhnert, Kirshner, & Thurston, 2011). A terapia anti-Dll4 revelou um modo de ação aparentemente paradoxal (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Sclafani et al., 2007; Gavin Thurston, Noguera-troise, & Yancopoulos, 2007). Apesar de funcionar como uma terapia pró-angiogénica por conduzir a uma maior densidade vascular, a neo-vasculatura formada é desorganizada, incapaz de transportar sangue, conduzindo rapidamente o tumor a uma situação de hipóxia e consequente limitação de crescimento.

Esta terapêutica, com base quer num anticorpo neutralizante seletivo para Dll4 quer numa proteína de fusão solúvel contendo o domínio extracelular, o sDll4Fc, que funciona presumivelmente por ligação competitiva com os recetores Notch, prevenindo assim a sua ativação pelo ligando Dll4 endógeno (Scehnet et al., 2007). Estes agentes revelaram uma robusta atividade antitumoral numa variedade de tumores humanos em modelos murinos xenotransplantados. Os tumores tratados com anti-Dll4 apresentam um marcado aumento da densidade vascular, mas são pouco perfundidos, o que conduz a um aumento da hipóxia. É importante salientar que a terapia anti-Dll4 demonstra bons resultados quando combinada com a terapia anti-VEGF (Ridgway et al., 2006), a terapia anti-angiogénica mais utilizada das atualmente disponíveis (Ranieri et al., 2006) e também em tumores resistentes à terapia anti-VEGF, sendo por isso muito promissora para uso clínico (J. L. Li et al., 2011). Recentemente, dois anticorpos anti-Dll4 entram em ensaios clínicos de fase I (Chiorean et al., 2015; ClinicalTrials.gov, 2012, 2014). O fato de o bloqueio de Dll4 ter uma ação antitumoral mesmo em tumores resistentes à terapia anti-VEGF revelou-se bastante interessante, uma vez que Dll4 é um conhecido regulador negativo da expressão do recetor para o VEGF (C. K. Williams, Li, Murga, Harris, & Tosato, 2006).

Os resultados obtidos nos ensaios com xenotransplantes foram uma primeira abordagem bastante importante, mas o passo seguinte exige que estas terapias sejam testadas em modelos tumorais autóctones e integradas em protocolos terapêuticos mais semelhantes aos usados em humanos.

A inibição das vias de sinalização angiogénicas tem-se revelado uma estratégia eficiente para o tratamento de diversos tumores sólidos (Potente, Gerhardt, & Carmeliet, 2011; Beverly A. Teicher, 2011) contudo, ainda não foi esclarecido se as terapias anti-angiogénicas poderão trazer algum benefício no tratamento do adenocarcinoma prostático (Mukherji, Temraz, Wehbe, & Shamseddine, 2013). É importante determinar o potencial da terapia anti-angiogénica em diversas fases da progressão deste tipo de tumor para identificar qual é que representa a melhor janela de oportunidade para intervir.

As terapias anti-angiogénicas raramente são aplicadas como mono-terapias (Ichihara, Kiura, & Tanimoto, 2011; Rogosin & Sandler, 2012). Regra geral, são terapias administradas concomitantemente ou como adjuvantes (Bellou, Pentheroudakis, Murphy, & Fotsis, 2013; Gerber & Ferrara, 2005). Observações atuais sobre o modo como as terapias anti-angiogénicas influenciam o aporte dos fármacos pelos tumores propõem que a normalização vascular deverá ser o principal objetivo (Goel et al., 2011; Goel, Wong, & Jain, 2012; Rakesh K. Jain, 2005). Esta normalização foi já alcançada com fármacos que reduzem o potencial angiogénico, como moléculas anti-VEGF. As moléculas anti-Dll4 atuam de forma contrária às anti-VEGF,

conduzindo a fenótipo pró-angiogénico não-funcional. O efeito dos agentes anti-Dll4 no aporte tumoral de outras moléculas terapêuticas (como por exemplo, citostáticos) ainda não foi avaliado e pode ser um determinante crucial da sua eficácia em condições clínicas.

Um dos principais estímulos para a saída de células tumorais do tumor primário para a circulação sanguínea é a hipóxia. De fato, vários autores observaram o aumento da expressão do ligando Dll4 na vasculatura de tumores transplantados em murganhos, mas também em amostras de tumores humanos, em resposta à redução da concentração de O₂ disponível, uma condição frequentemente encontrada no microambiente tumoral.

Todavia, a hipóxia tumoral resultante da menor funcionalidade da vasculatura tumoral, que se observa em ratinhos com perda-de-função do gene *Dll4*, poderá promover a formação de metástases. Além disso, a maior permeabilidade desses vasos poderá também facilitar essa primeira etapa.

No entanto, num modelo murino transgénico de carcinoma mamário (MMTV-ErbB2), utilizado essencialmente para estudar o efeito da ablação genética de *Dll4* no crescimento do tumor primário, constatou-se que o número de metástases pulmonares era menor nos animais heterozigóticos para *Dll4* (dados não publicados). Várias hipóteses podem explicar este fenótipo. A vasculatura mais imatura e permeável no tumor primário poderá atuar como uma “peneira” para as células neoplásicas invasoras acabando por não as conduzir para os locais distantes. Alternativamente, as células endoteliais com menor expressão de Dll4 podem de alguma forma prevenir a intravasação ou a extravasação. Contudo, pode também existir um mecanismo não-endotelial relacionado com a diferenciação mielóide de neutrófilos pré-metastáticos necessários para uma colonização bem-sucedida.

A determinação do papel, quer endotelial quer não-endotelial, do ligando Dll4 nas várias etapas do processo metastático permitirá consolidar a validação deste ligando como um alvo terapêutico útil e promissor.

Quase todos os agentes anti-angiogénicos aprovados incluem a doença metastática nas suas indicações clínicas. Porém, a maioria dos estudos pré-clínicos apenas examina o efeito dos agentes anti-angiogénicos nos tumores primários. Apesar de já estarem em desenvolvimento melhores modelos murinos da doença avançada, os estudos pré-clínicos raramente são conduzidos em contexto adjuvante ou metastático (Francia, Cruz-Munoz, Man, Xu, & Kerbel, 2011). Vale a pena salientar que a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovará mais rapidamente um novo agente anti-angiogénico no caso de este demonstrar uma resposta patológica completa. Por outro lado, os estudos de metastização realizados em modelos murinos geneticamente modificados (GEMMs – *Genetically Engineered Mouse Models*) com perda-de-função de um determinado gene, representam um contexto de prevenção e não de intervenção,

que é o que é necessário na maioria dos casos clínicos. Além disso, muitos modelos murinos tendem a subestimar a toxicidade. Todas estas limitações devem ser tidas em consideração quer no delineamento experimental, quer na interpretação dos dados obtidos a partir deste tipo de modelos (Rakesh K. Jain, 2014).

A investigação sobre a colonização metastática tem sido prejudicada pela complexidade inerente ao processo e por uma falta de modelos experimentais adequados. A escassez de modelos experimentais que incorporem uma fase latente e o custo de estudar estes processos durante os longos períodos de tempo necessários para que estes processos se completem em modelos animais, além das dificuldades técnicas inerentes à análise de células isoladas localizadas em tecidos vivos muito extensos, têm atrasado o progresso nesta área do conhecimento (Chaffer & Weinberg, 2011; Ghajar et al., 2013; Goss & Chambers, 2010; Massagué & Obenauf, 2016).

A metastização é um evento raro na maioria dos modelos murinos transgênicos de cancro. Menos de 30% destes modelos demonstraram uma penetrância de 100% do fenótipo metastático (Gallahan et al., 1996; Jeffrey R. Gingrich et al., 1996; C T Guy, Cardiff, & Muller, 1992; Jhappan et al., 1992; Penna, Schmidt, & Beermann, 1998; Perez-stable, Altman, Mehta, Deftos, & Roos, 1997; Z. T. Zhang, Pak, Shapiro, Sun, & Wu, 1999). Além disso, devido à variabilidade na disseminação tumoral e penetrância da doença metastática, é difícil, se não mesmo impossível, fazer um correto estadiamento dos animais ou detetar a presença de doença metastática antes da morte (Khanna & Hunter, 2005). Assim, no processo metastático cada etapa deverá ser estudada tendo presentes as vantagens e limitações de cada tipo de modelo pré-clínico de metastização. Só dessa forma será possível identificar os melhores alvos moleculares em cada fase e delinear estratégias terapêuticas apropriadas a cada contexto clínico.

Os mecanismos moleculares subjacentes à formação de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existent (angiogénese) continuam a ser alvo de estudos cada vez mais aprofundados. Muitos avanços têm sido feitos e hoje já se conhecem diversas vias de sinalização responsáveis pela proliferação, maturação e estabilização dos novos vasos sanguíneos.

No caso da angiogénese tumoral, esta recapitula, pelo menos em parte, o desenvolvimento vascular embrionário. Compreender melhor os mecanismos moleculares implicados no desenvolvimento vascular embrionário permitirá encontrar novos alvos terapêuticos na luta contra o cancro.

A tetraspanin18 (Tspan18) está ainda muito pouco estudada e até à data existem muito poucas publicações sobre esta proteína transmembranar. Contudo, para outras moléculas desta família de proteínas transmembranares, foi já demonstrado um importante papel na angiogénese fisiológica e tumoral.

Dados não publicados, produzidos no laboratório do Dr. Parkash S. Gill na Califórnia, colaborador habitual do laboratório de acolhimento, indicam que a Tetraspanin18 (Tspan18) é expressa nos grandes vasos e nos vasos intersegmentares em desenvolvimento do embrião de murganho com 13,5 dpc (*days post coitum*).

O mesmo laboratório colaborador, levou a cabo estudos de perda-de-função de Tspan18 em peixe-zebra e *in vitro*.

No peixe-zebra, o desenvolvimento de embriões mutantes demonstrou-se atrasado comparativamente com os controlos, apresentando a região distal, incluindo a cauda, curvada, extensos defeitos vasculares, frequência cardíaca diminuída e edema do pericárdio. Assim, no peixe-zebra, a perda-de-função de Tspan18 parece afetar a angiogénese, mas não a vasculogénese. Foi assim elucidado um importante papel de Tspan18 na regulação da indução, direção e estabilidade dos vasos recém-formados.

Estudos de expressão génica, utilizando o *GeneChip Zebrafish genome array*, demonstraram que nos embriões mutantes, Sema-3AB (*Semaphorin-3AB* o ortólogo de Sema-3A no peixe-zebra) estava aumentada. Esta maior expressão, funciona como armadilha para Nrp1 e atenua a sinalização por VEGF/VEGF-R2. A análise de hibridação *in situ* em *whole-mount* confirmou os dados do GeneChip e verificou-se a diminuição de VEGF, Notch3, Dll4 e EphrinB2. Contrariamente, observou-se um aumento de expressão de EphB4 e VEGF-R3. Assim, a redução da sinalização VEGF/VEGF-R2/Notch e o aumento de VEGF-R3/EphB4 sugere um papel para Tspan18 na determinação da identidade arterial-venosa, regulando positivamente marcadores arteriais como o Notch3, Dll4 e EphrinB2 e negativamente marcadores venosos, particularmente EphB4.

Tspan18 também regula a sinalização Sema-3A/Nrp-PlexD1. O aumento da ligação de Sema3A e PlexD1 a Nrp pode reduzir a disponibilidade de Nrp para se ligar a VEGF.

Assim, neste modelo, Tspan18 regula a angiogénese e o fenótipo arterial em relação ao venoso através da regulação de componentes da via de sinalização Notch e VEGF, mas a forma principal de atuação de Tspan18 nesta regulação é provavelmente através de VEGF/VEGF-R2. Foi também demonstrado, por ensaios de imunoprecipitação, que Tspan18 interage diretamente com VEGF-R2 e Nrp1, mas não com EphB4.

Os dados obtidos *in vivo* no peixe-zebra foram confirmados através de ensaios *in vitro* utilizando Tspan18 siRNA em culturas de células HUAEC (*Human Umbilical Artery Endothelial Cells*). As células com deficiência de Tspan18 apresentaram menor viabilidade e por isso uma redução da migração, invasão e formação de túbulos. Foi ainda demonstrado *in vitro*, que Tspan18 pode regular o *turnover* do ARNm (ácido ribonucleico mensageiro) para VEGF-R2.

Tspan18 apresenta assim um papel crítico na mediação da angiogénese através de VEGF-R2, uma vez que a deficiência de Tspan18 e os seus efeitos podem ser revertidos através da reposição de VEGF-R2 no meio.

Em conclusão, a Tspan18 parece ser responsável por efeitos pró-angiogénicos através da indução da expressão de VEGF/VEGF-R2. Por outro lado, parece também favorecer o fenótipo arterial através da indução da expressão de Notch3/Dll4 e EphrinB2 e por regular a via de sinalização Sema3ab/Nrp-PlexinD1 que fornece pistas adicionais nos vasos em proliferação.

As alterações fenotípicas observadas em murganhos mutantes com perda-de-função constitutiva de Tspan18, não revelaram qualquer função vital desta tetraspanin na embriogénese. Podemos assim deduzir que a Tspan18 possivelmente não tem um papel fundamental durante a vasculogénese. Os mutantes com perda-de-função constitutiva (disponíveis em repositório) não permitem, contudo, o estudo do envolvimento desta proteína em processos angiogénicos fisiológicos ou patológicos durante a vida adulta.

Apesar disso, sabemos que existem diversas citocinas, fatores de crescimento, enzimas e recetores de membrana que apenas se revelam essenciais em situações de desequilíbrio da homeostasia. Deste modo, e tendo em conta os dados preliminares facultados pelos nossos colaboradores, iniciámos os trabalhos conducentes à produção de murganhos com perda condicional e induzível de Tspan18, de modo a estudar a função desta proteína transmembranar de uma forma controlada no espaço e no tempo.

OBJETIVOS

O trabalho experimental desenvolvido no âmbito desta tese de doutoramento teve três objetivos principais:

i) avaliar a eficácia da terapia anti-Dll4 numa fase precoce e numa fase tardia do desenvolvimento do adenocarcinoma prostático, para compreender qual o momento ótimo para intervir com este tipo de terapêutica em diferentes contextos de diagnóstico da doença. Por outro lado, pretendeu-se também avaliar os potenciais benefícios da associação da terapia Dll4Fc com agentes citostáticos habitualmente usados no tratamento do cancro da próstata. Estas duas abordagens visam estabelecer um paralelo com os cenários de intervenção terapêutica mais comuns no tratamento do adenocarcinoma prostático humano e melhorar a previsão da eficácia terapêutica do sDll4Fc no tratamento de outros pacientes oncológicos. Assim, propusemo-nos a validar e testar mecanisticamente a eficácia da terapia anti-Dll4 num modelo murino transgénico de cancro da próstata (TRAMP – *TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate*), quando usada isoladamente ou em combinação com quimioterapia metronómica.

ii) validar modelos murinos de metastização para averiguar a função endotelial do gene *Dll4* quer nos processos de invasão e intravasação, quer na progressão de micrometástases para macrometástases.

iii) produzir uma linha de murganhos mutantes com perda-de-função condicional e induzível de Tspan18, para que possamos compreender a função desta Tspan no angiogénese dos mamíferos e estudar se esta proteína tem potencial para se tornar num novo alvo da terapia oncológica anti-angiogénica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A vasculatura tumoral como alvo terapêutico

Dado o grande número de mutações que se acumulam e o rápido desenvolvimento de mecanismos de escape nas células neoplásicas, uma terapêutica dirigida às células do estroma tumoral deverá ter efeitos mais duradouros. Nesta área, um dos marcos mais proeminentes foi o desenvolvimento de terapias dirigidas à vasculatura tumoral. Atingir a vasculatura tumoral aberrante, não-funcional, é hoje uma das abordagens mais promissoras das novas terapias antitumorais (Ehling & Mazzone, 2016).

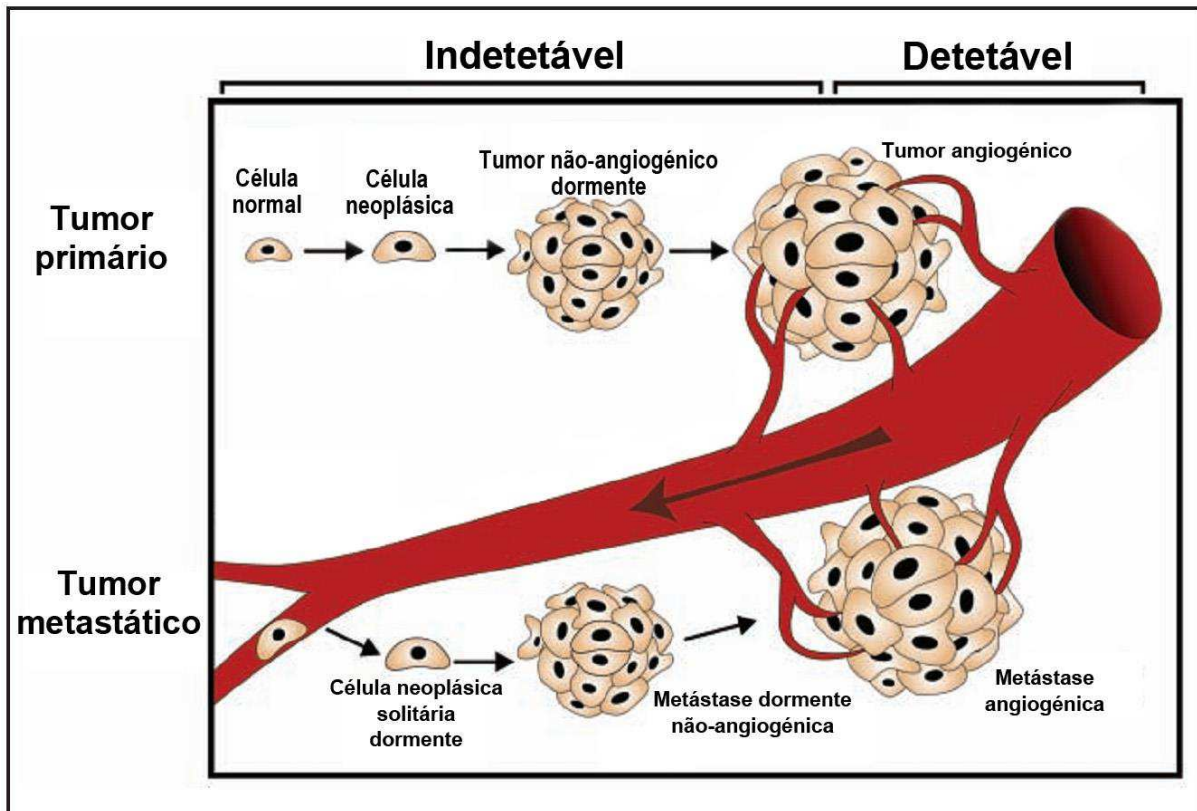
Primeiro, as células atingidas, as células endoteliais, estão em contato direto com o sangue, estando assim assegurado o efeito de fármacos que sejam administrados por via endovenosa. Segundo, a erradicação de apenas algumas células endoteliais, acaba por causar um efeito tipo “avalanche” ao conduzir à morte de muitas células neoplásicas que estão dependentes de um único capilar. Terceiro, tendo em conta que as células endoteliais são geneticamente estáveis, a probabilidade de desenvolverem resistência aos fármacos é baixa. Por fim, como em condições de homeostasia fisiológica as células endoteliais se encontram normalmente num estado quiescente, e a terapia anti-angiogénica é dirigida apenas a células endoteliais ativadas, os efeitos adversos deverão ser limitados (Griffioen & Molema, 2000; Weis & Cheresh, 2011).

2.1.1. Angiogénese tumoral

A formação de novos capilares sanguíneos, a partir de vasos pré-existentes (angiogénese), não só é necessária para o crescimento do tumor primário como é também fundamental para a metastização, constituindo por isso um importante ponto de controlo na progressão do cancro (Figura 1) (J. Folkman, 2002).

Em 1971, a observação de que o crescimento tumoral é dependente de angiogénese levou à proposta do conceito de anti-angiogénese para designar a prevenção da penetração de novos brotes vasculares no interior de um implante tumoral incipiente (J. Folkman, 1971). Desde então que vários grupos de investigação se têm dedicado a descobrir, isolar e purificar inibidores da angiogénese. Os primeiros inibidores da angiogénese foram descritos na década de 80 (Crum, Szabo, & Folkman, 1985; S. Taylor & Folkman, 1982) do século passado pelo laboratório de Folkman, num estudo que continuou durante os 25 anos seguintes. Antes de 1980 não existiam inibidores da angiogénese e nessa altura poucos cientistas acreditavam que tais moléculas fossem alguma vez descobertas (Judah Folkman, 2007).

Figura 1 - Papel da angiogénese tumoral no local primário e metastático. Quer os tumores primários, quer as metástases, podem permanecer num estado dormente (em que a proliferação das células neoplásicas é compensada pela apoptose) com um tamanho microscópico devido à ausência de angiogénese. Além disso, no local metastático podem persistir células neoplásicas solitárias dormentes na fase G0 do ciclo celular. Apenas os tumores primários e as metástases angiogénicas são clinicamente detetáveis. Os tumores microscópicos e as células solitárias dormentes permanecem ocultos durante longos períodos de tempo. Traduzido e adaptado de (Naumov et al., 2006).



Quanto mais complexo um sistema se torna, mais vulnerável fica a vários tipos de perturbação. O processo angiogénico, encaixa-se claramente na classe de sistemas altamente complexos, tal como é demonstrado pela sua dependência de múltiplos tipos celulares e moléculas de sinalização. Uma vez que os tumores dependem absolutamente da angiogénese para crescer além do limite de difusão do oxigénio (~ 0.2 mm de diâmetro), qualquer sucesso no bloqueio da angiogénese ou em desfazer os seus produtos, representa uma estratégia altamente eficaz para tratar o cancro. Os tumores microscópicos são impedidos de crescer, enquanto os tumores maiores deverão colapsar assim que o seu suprimento sanguíneo já estabelecido se desintegre (Weinberg, 2014a).

A correlação entre a angiogénese e a metastização tumoral deriva essencialmente de duas observações. Primeiro, em modelos animais de cancro, a administração de compostos com propriedades anti-angiogénicas resulta numa redução da vascularização do tumor primário que é quase sempre associada a uma redução na formação de colónias metastáticas (Zetter, 1998). A lista de inibidores angiogénicos que também inibem a metastização tumoral inclui os

esteroides angiostáticos (Crum et al., 1985), a talidomida (D'Amato, Loughnan, Flynn, & Folkman, 1994), o análogo da fumagilina TNP-470 (Ingber et al., 1990; Konno et al., 1995), a trombospondina (D. L. Weinstat-Saslow et al., 1994), angiostatina (M. O'Reilly et al., 1994), endostatina (Michael S O'Reilly et al., 1997), o fator plaquetário (Kolber, Knisely, & Maione, 1995) e o inibidor da protease sintético BB94 (Watson et al., 1995). Segundo, vários estudos demonstram uma correlação entre a produção de fatores angiogénicos, a recidiva de metástases e o mau prognóstico em pacientes com cancro (Nanus et al., 1993; Relf et al., 1997; Toi, Hoshina, Takayanagi, & Tominaga, 1994).

O crescimento das micrometástases (< 2 mm diâmetro) para macrometástases (> 2 mm diâmetro), isto é, a colonização, é claramente a etapa limitante e fundamental que determina se a doença metastática se manifesta ou não (Weinberg, 2014b). Num local secundário, as células neoplásicas podem existir em três estados separados: como células solitárias que não se dividem, como micrometástases pré-angiogénicas, e como metástases vascularizadas, que podem ser ou muito pequenas e clinicamente indetetáveis ou maiores e detetáveis pelas técnicas de diagnóstico atuais (Figura 1). Note-se que células nos três estados podem estar presentes no mesmo órgão ao mesmo tempo (Ann F. Chambers, Groom, & MacDonald, 2002). Assim, em locais secundários, a dormência angiogénica é caracterizada por lesões micrometastáticas avasculares que não crescem além de 2 mm de diâmetro (de acordo como limite de difusão do oxigénio) devido à existência de um equilíbrio entre proliferação e apoptose (Figura 1) (Naumov, Akslen, & Folkman, 2006).

A capacidade para induzir e manter a angiogénese parece ser adquirida numa etapa discreta durante o desenvolvimento tumoral, por meio de um “interruptor angiogénico”. Esta aquisição de propriedades angiogénicas e vascularização por parte do tumor, permite a transição de um fenótipo quiescente para um fenótipo invasivo (J. Folkman, 2002).

Um conjunto de fortes evidências indicam que o “interruptor angiogénico” é regulado por fatores que ou induzem ou se opõem à angiogénese (Baeriswyl & Christofori, 2009; Bergers & Benjamin, 2003).

Quando fatores pró-angiogénicos e inibidores angiogénicos são ativados e reprimidos, respetivamente, o equilíbrio pende para o lado pró-angiogénico e uma hiperplasia avascular dormente pode assim transitar para um tumor vascularizado de maiores dimensões e eventualmente evoluir para uma progressão tumoral maligna (Baeriswyl & Christofori, 2009; Naumov et al., 2006).

Estes fatores incluem não só fatores moleculares e mutações genéticas (por exemplo, a ativação de oncogenes ou a deleção de genes supressores tumorais que controlam a produção de moléculas reguladoras da angiogénese) mas também fatores do microambiente, como o stress

metabólico (baixa pressão de oxigênio, baixo pH ou hipoglicemia), stress mecânico (a pressão gerada pelas células em proliferação) e a infiltração por células imunitárias/inflamatórias (Baeriswyl & Christofori, 2009; Carmeliet, 1999; R. S. Kerbel, 2000).

Moléculas pró- e anti-angiogénicas podem ter origem nas células neoplásicas, nas células endoteliais ou nas células do estroma, no sangue ou na matriz-extracelular (Fukumura et al., 1998). A contribuição relativa dos fatores de cada uma destas fontes pode variar consoante o tipo tumoral e o local onde se desenvolve o tumor. Pode também variar à medida que o tumor cresce, regride ou reincide. Assim, apesar de a ativação do “interruptor angiogénico” ocorrer durante as primeiras etapas do desenvolvimento tumoral (o que implica o marco da indução de angiogénese como uma etapa auto-limitante durante o desenvolvimento de muitos tumores sólidos (D. Hanahan & Folkman, 1996)), este pode ser desligado e ligado novamente dependendo do equilíbrio entre os diversos fatores em cada momento da progressão tumoral (Carmeliet & Jain, 2000).

Quando o interruptor angiogénico é ativado, inicia-se a angiogénese, ou seja, formação de novos vasos sanguíneos por brotamento a partir dos vasos sanguíneos pré-existentes (J. Folkman, 1971). Mas, os tumores podem ser vascularizados por outros mecanismos, nomeadamente, por vasculogénese (Risau & Flamme, 1995), intuscepção (Burri, Hlushchuk, & Djonov, 2004), mimetismo vascular (R. Wang et al., 2010), mimetismo vasculogénico (Maniotis et al., 1999) ou transdiferenciação (Eklund, Bry, & Alitalo, 2013) e por cooptação vascular (Saharinen, Eklund, Pulkki, Bono, & Alitalo, 2011).

Durante o brotamento angiogénico, a observação de que nem todas as células endoteliais se comportam da mesma forma revela que existe uma coordenação comportamental. No brotamento angiogénico, o conceito “ponta-caule” (“*tip-stalk*”), descreve dois fenótipos celulares distintos com base nos seus perfis de expressão genética e nas especificações funcionais das células endoteliais que constituem um brote capilar recém-formado. A célula líder, denominada de “célula-ponta” (“*tip-cell*”), é migratória e polarizada. Esta célula projeta longas extensões especializadas, os *filopodia*, que analisam o ambiente circundante para detetar a presença de sinais de atração ou repulsão, funcionando assim como guia do crescimento do novo vaso sanguíneo numa determinada direção. Adjacentes à “célula-ponta”, as células que a precedem, denominadas “células-caule” (“*stalk-cells*”), proliferam durante a extensão do brote e formam o lúmen vascular nascente (Geudens & Gerhardt, 2011).

A migração das células-ponta pode ocorrer sem proliferação das células-caule e vice-versa. Contudo, apenas um equilíbrio regulado entre ambos os processos estabelece brotes nascentes com a forma adequada (Geudens & Gerhardt, 2011).

As células endoteliais expostas a estímulos angiogénicos entram no estado ativado e competem pela posição de “célula-ponta”. Assim, apenas uma fração das células endoteliais adquire o fenótipo de célula-ponta (Jakobsson et al., 2010). As restantes células endoteliais formam o caule do brote vascular ou ficam para trás para manter a integridade e perfusão da cama vascular crescente (Eilken & Adams, 2010).

Este processo de competição/seleção limita o número de brotes em crescimento. Por fusão (anastomose) dos brotes, estabilização e remodelação das ligações recém-formadas são formadas redes vasculares (Geudens & Gerhardt, 2011).

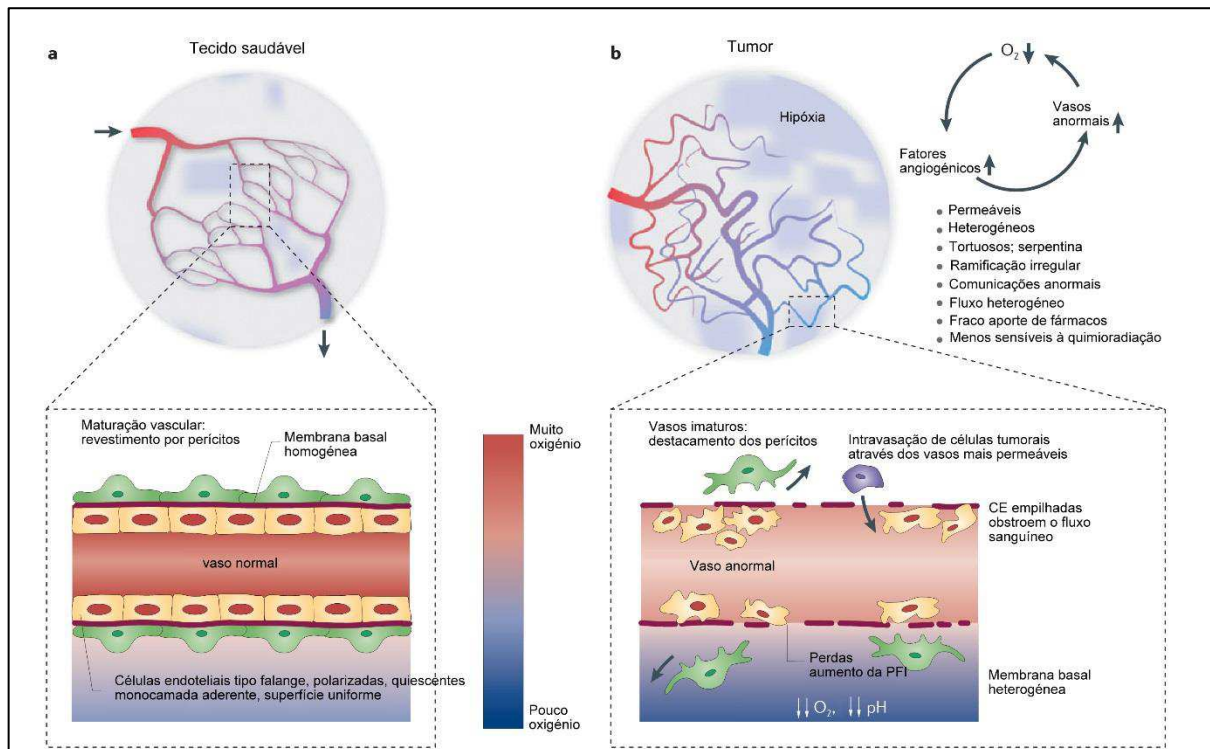
A rede de fatores de crescimento e recetores utilizados durante a angiogénese tumoral é semelhante à que opera durante angiogénese fisiológica e que ocorre durante o desenvolvimento embrionário (Arroyo & Iruela-Arispe, 2010; Warren & Iruela-Arispe, 2010).

Contudo, o processo angiogénico encontra-se ativado de uma forma crónica devido à ausência de um controlo regulador transversal no tecido hospedeiro e à desregulação do equilíbrio entre o conjunto de inibidores e ativadores da angiogénese (Baluk, Hashizume, & McDonald, 2005; Benazzi et al., 2014; Bussolati, Grange, & Camussi, 2011; J. A. Nagy, Chang, Shih, Dvorak, & Dvorak, 2010; Ziyad & Iruela-Arispe, 2011). Além disso, nos tumores o processo de maturação e estabilização vascular encontra-se muitas vezes perturbado. Os vasos sanguíneos tumorais nunca entram num estado verdadeiramente quiescente, permitindo o crescimento e remodelação constantes, o que leva ao estabelecimento de uma vasculatura tumoral com características únicas e bastante distintas da que constitui o sistema circulatório normal (Bergers & Benjamin, 2003).

As transformações estruturais induzidas pela sinalização parácrina anómala e pelo contato das células neoplásicas com o endotélio levam à formação de uma rede vascular tumoral estrutural e funcionalmente anómala (Figura 2) (Ziyad & Iruela-Arispe, 2011).

Os vasos tumorais são hiperpermeáveis (Figura 2) (Rakesh K. Jain, 2005). O seu padrão de distribuição é extremamente irregular. Muitas vezes descrevem um percurso tipo serpentina, ramificando-se de forma excessiva e irregular numa rede caótica embaraçada e ligando-se entre si de modo aleatório (Baluk et al., 2005; Carmeliet & Jain, 2011b; Rakesh K. Jain, 1988, 2005; Massimiliano Mazzone et al., 2009; J. A. Nagy et al., 2010). São também fenotipicamente heterogéneos exibindo um espectro de subtipos vasculares desde capilares e vasos “mãe” (sinusoides fenestrados, grandes, permeáveis, de parede fina sem revestimento por perícitos) a formações de vasos glomerolóides e malformações vasculares (Figura 2) (Baluk et al., 2005; Pettersson et al., 2000).

Figura 2 - Os vasos tumorais são estrutural e funcionalmente anormais. a) no tecido saudável, forma-se uma vasculatura que respeita um padrão regular (painel superior) e que apresenta uma parede vascular e endotélio normais (painel inferior). **b)** nos tumores sólidos estabelecidos, a vasculatura (painel superior), assim como o endotélio e a parede vascular (painel inferior), exibem anomalias estruturais e funcionais que conduzem ao aparecimento de regiões com hipóxia e acidose severa (representadas por sombra azul). CE – célula endotelial; PFI – pressão do fluido intersticial. Traduzido e adaptado de (Carmeliet & Jain, 2011b).



As anomalias estruturais são responsáveis por uma funcionalidade também anormal (Figura 2). Nos vasos tumorais o fluxo sanguíneo é frequentemente bidirecional e/ou intermitente, ou seja, a perfusão não é constante (David J. Chaplin, Olive, & Durand, 1987). Devido à hiperpermeabilidade e às frequentes fugas focais, as taxas de fluxo sanguíneo apresentam-se muitas vezes reduzidas (Fan Yuan et al., 1994) sendo os processos de oxigenação e remoção de resíduos metabólicos do tumor, bastante ineficientes (Fukumura, Duda, Munn, & Jain, 2010). Por se apresentarem hipovascularizadas, algumas áreas do tumor acabam por se tornar cronicamente hipóxicas e ácidas, enquanto outras regiões apresentam-se hipóxicas e ácidas apenas transitoriamente devido ao fluxo sanguíneo intermitente (Fukumura et al., 2010). A heterogeneidade da perfusão tumoral, progressivamente pior à medida que os tumores crescem, levanta um enigma interessante: se um tumor necessita de vasos sanguíneos para crescer e metastizar, como é que continua a crescer quando o próprio crescimento inibe o mesmo suprimento sanguíneo de que depende para ter acesso a nutrientes e oxigênio e eliminar os produtos do metabolismo? Este aparente paradoxo pode ser compreendido se pensarmos que uma redução do suprimento sanguíneo se pode converter numa vantagem de sobrevivência para estas células renegadas, precisamente através da criação de um microambiente anormal

caracterizado por hipóxia e acidose. Jain (2014) propõe que o menor aporte sanguíneo e o microambiente anormal resultante, ajuda as células neoplásicas a evadirem-se do sistema imunitário, a aumentar o seu potencial metastático e invasivo, e a aplicar pressões de sobrevivência seletiva às quais as populações de células neoplásicas se adaptam (Rakesh K. Jain, 2014).

A hipóxia, o baixo pH e a elevada pressão intersticial, podem alterar as características intrínsecas das células neoplásicas resultando numa seleção dos clones mais agressivos. Aqueles que são capazes de alterar vias de sinalização, nomeadamente através da entrada no programa de transição epitélio-mesenquimal (EMT – *Epithelial to Mesenchymal Transition*), conseguem a fuga através dos vasos permeáveis (Rakesh K. Jain, 2005), favorecendo assim a metastização (Benazzi et al., 2014).

O microambiente hipóxico e ácido reprograma os macrófagos residentes (fagócitos) para um fenótipo pró-tumorigénico e imunodepressivo (Casazza et al., 2014; Colegio et al., 2014; Finger & Giaccia, 2010; Douglas Hanahan & Coussens, 2012; Keith, Johnson, & Simon, 2012; Motz & Coukos, 2013; Noy & Pollard, 2014; Palazón, Aragonés, Morales-Kastresana, de Landázuri, & Melero, 2012; Semenza, 2014; William R. Wilson & Hay, 2011) e atenua as capacidades mortíferas das células imunitárias efectoras no interior do microambiente tumoral (Barsoum, Smallwood, Siemens, & Graham, 2014; Calcinotto et al., 2012; Gabrilovich, Ostrand-Rosenberg, & Bronte, 2012; Palazón et al., 2012). Além da proteção do sistema imunitário, a hipóxia participa também na seleção das células neoplásicas mais malignas pois as células normais (mais benignas), que respondem às pistas fisiológicas, normalmente acabam por sofrer apoptose sob condições hipóxicas (William R. Wilson & Hay, 2011). A hipóxia pode ainda aumentar o potencial invasivo das células neoplásicas por induzir a produção de proteínas pró-migratórias (como, SDF-1 α e HGF) e de proteínas pró-invasivas da matriz extracelular (Finger & Giaccia, 2010; Gilkes, Semenza, & Wirtz, 2014). A hipóxia cria ainda um nicho para as células neoplásicas estaminais e facilita a inflamação. Coletivamente, estas observações podem explicar o porquê da hipóxia intratumoral se correlacionar com um mau prognóstico nos pacientes oncológicos (William R. Wilson & Hay, 2011).

As condições microambientais aberrantes resultantes das características anormais da vasculatura tumoral, muitas vezes impedem o sucesso de estratégias terapêuticas antitumorais convencionais (Vaupel, Fortmeyer, Runkel, & Kallinowski, 1987). A hipóxia microrregional pode resultar na resistência quer à radioterapia (Vaupel, Schlenger, Knoop, & Höckel, 1991) quer à quimioterapia (Boucher, Brekken, Netti, Baxter, & Jain, 1998; Fukumura & Jain, 2007; Vaupel & Hockel, 2000). O referido aumento de pressão intersticial pode reduzir a eficácia de fármacos antitumorais, ao impedir a formação de um gradiente de pressão, entre o lúmen capilar

e o parênquima, suficiente para a eficiente transferência dos fármacos da circulação para os espaços extravasculares do tumor (Weinberg, 2014a).

De qualquer modo, as características únicas da vasculatura tumoral, representam uma oportunidade para intervir terapêuticamente de forma seletiva (Siemann, 2011).

2.1.2. Principais abordagens terapêuticas

O interesse em atingir as células endoteliais associadas aos tumores resulta da biologia peculiar destas células. Na massa tumoral, elas são formadas e perdidas continuamente, com tempos de semivida que são tão curtos como uma semana. As células em proliferação ativa são, quase sempre, muito mais sensíveis à morte induzida por fármacos do que as células quiescentes. Por esta razão, as terapias citotóxicas dirigidas contra as células endoteliais deverão ter efeitos drásticos na vasculatura associada ao tumor, ao mesmo tempo que deixam os vasos sanguíneos de outros locais do corpo íntegros (Weinberg, 2014a).

De fato, sem se saber, a terapia anti-angiogênica tem sido usada há muitos anos, pois muitos dos efeitos antitumorais das terapias convencionais podem derivar do seu efeito na microvasculatura associada ao tumor. Por exemplo, a radiosensibilidade de certos tumores revelou-se não ser intrínseca às células neoplásicas. Em vez disso, verificou-se que seria sobretudo da responsabilidade de células do hospedeiro, especificamente de células da medula óssea recrutadas para os tumores transplantados. Estas células do hospedeiro recrutadas revelaram ser células endoteliais, tal como foi evidenciado pelo fato de (1) a apoptose das células endoteliais nos fragmentos de tumor irradiado *in vitro* ser diretamente proporcional e preditiva do comportamento *in vivo* dos tumores e, (2) pouco depois da irradiação, as únicas células que demonstram uma apoptose significativa nos tumores encontram-se associadas aos capilares (Weinberg, 2014a).

Do mesmo modo, as respostas clínicas a certos tipos de quimioterápicos convencionais podem também ser fortemente influenciadas pela sensibilidade da microvasculatura tumoral a estes agentes. No futuro, os tratamentos com muitos dos quimioterápicos antitumorais poderão ser otimizados através da aferição dos seus efeitos na microvasculatura tumoral e combinando-os com os efeitos já conhecidos nas células neoplásicas (Weinberg, 2014a).

Quase quatro décadas após o conceito de “anti-angiogénese” ter sido introduzido por Judah Folkman, a terapia anti-angiogénica é hoje considerada uma das principais modalidades de tratamento antitumoral (Ebos & Kerbel, 2011).

Duas estratégias terapêuticas fundamentais emergiram: aquelas que interferem com a iniciação da formação de vasos sanguíneos no tumor (agentes anti-angiogénicos, AAs) e aquelas que são dirigidas à rede de vasos sanguíneos já estabelecidos (agentes disruptores vasculares, VDAs)

(Siemann, 2011). Estas duas classes diferem em três aspectos fundamentais: o seu alvo fisiológico, o tipo e extensão da doença que é suscetível e a calendarização do tratamento (Siemann et al., 2005). De fato, ensaios pré-clínicos já estabeleceram que tumores numa fase precoce são mais suscetíveis aos AAs e que tumores numa fase mais avançada são tratados de forma mais eficiente por VDAs (Gerber & Ferrara, 2005; Siemann & Rojiani, 2005). Uma vez que metástases em várias fases do seu desenvolvimento (dormentes, fases iniciais do crescimento, ou lesões macroscópicas bem estabelecidas) podem existir simultaneamente em diversos órgãos, elas apresentar-se-ão com diferentes níveis de desenvolvimento vascular e consequentemente serão suscetíveis a diferentes abordagens terapêuticas dirigidas aos vasos sanguíneos (Salmon, Guha, Rojiani, & Siemann, 2012).

Os VDAs antitumorais são seletivamente dirigidos às células endoteliais imaturas e em rápida proliferação (Denekamp, 1982, 1984), na vasculatura tumoral. Exercem a sua ação quer por desencadear a apoptose diretamente, quer através de efeitos relacionados com a dependência das células endoteliais no citoesqueleto de tubulina para manter a forma celular. Estes agentes têm como objetivo inibir o fluxo sanguíneo nos tumores, com a isquemia resultante a ser responsável por uma cascata de morte celular tumoral secundária na região central dos tumores (D. J. Chaplin, Pettit, & Hill, 1999; Dark et al., 1997; X. Huang et al., 1997).

Uma propriedade importante que distingue os AAs das restantes terapias dirigidas, é que estes são tipicamente administrados a pacientes não selecionados para as indicações aprovadas, enquanto as terapias dirigidas especificamente às células neoplásicas são administradas apenas a subconjuntos de pacientes selecionados com base na sua expressão de biomarcadores (Rakesh K. Jain, 2014).

Apesar de já terem sido identificadas diversas moléculas com funções críticas no recrutamento de vasos sanguíneos, até à data a maioria dos estudos tem-se focado no VEGF e nos seus recetores. De fato, desde 2004, dez fármacos que são especificamente dirigidos para o VEGF ou para os seus recetores, foram aprovadas para o tratamento de várias doenças malignas (Rakesh K. Jain, 2014). O desenvolvimento contínuo de fármacos anti-angiogénicos tem também avaliado os potenciais benefícios de usar como alvo uma série de outras vias de sinalização pró-angiogénica, incluindo as que envolvem o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF – *basic Fibroblast Growth Factor*), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF – *Platelet Derived Growth Factor*), o fator de crescimento placentário (PIGF – *Placental Growth Factor*), o fator de crescimento tipo insulina (IGF – *Insulin like Growth Factor*), o alvo mamífero da rapamicina (mTOR – *mammalian target of rapamycin*) e deacetilases das histonas (Eskens, 2004; C. Fischer et al., 2007; Kapoor & Figlin, 2009; Melillo, 2006; Michaelis et al., 2004; Qian et al., 2004).

O objetivo inicial dos AAs era matar as células neoplásicas “à fome” através de uma inibição completa da angiogênese tumoral, mantendo desse modo o crescimento tumoral abaixo de um certo limiar. Contudo este conceito foi desafiado quando se tornou claro que os tumores conseguiam adaptar-se a tais condições adversas de crescimento (Ehling & Mazzone, 2016).

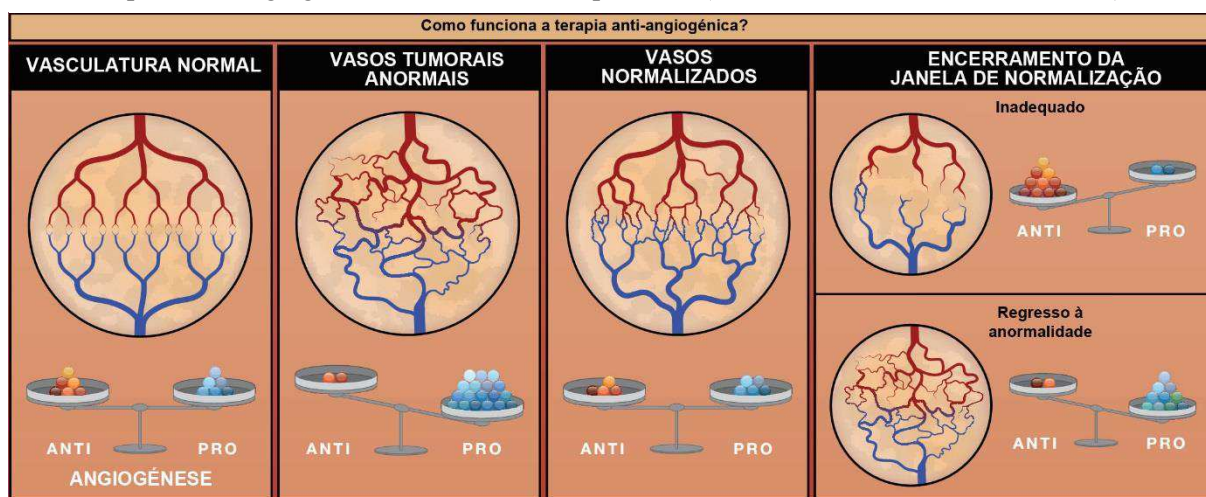
Ao contrário da maioria dos estudos pré-clínicos, a monoterapia com bevacizumab (o primeiro anticorpo anti-VEGF aprovado para uso clínico, em 2004, e comercializado com o nome Avastin®) não demonstrou um benefício acrescido na sobrevivência geral (*overall survival benefit*) dos pacientes (Rakesh K. Jain, 2005). Em múltiplos ensaios de fase III, este anticorpo apenas conferiu um benefício na sobrevivência quando usado em combinação com a quimioterapia. Estas observações clínicas são aparentemente paradoxais (Rakesh K. Jain, 2014), porque a regressão vascular desencadeada por este anticorpo deveria teoricamente prejudicar e não melhorar os efeitos da quimioterapia sistêmica (Goel et al., 2011). Para explicar o paradoxo de, como é que fármacos concebidos para destruir os vasos sanguíneos apenas beneficiam os pacientes por melhorarem a eficácia de terapias que dependem desses mesmo vasos sanguíneos para alcançar o seu alvo, foi avançada a hipótese da “normalização vascular” (Figura 3) (Goel et al., 2011; Rakesh K. Jain, 2001, 2005).

A hipótese de “normalização vascular” estabelece que a terapia anti-angiogênica, direta ou indireta (geralmente uma terapia dirigida a neutralizar a atividade do VEGF), reestabelece o equilíbrio entre fatores pró- e anti-angiogênicos, quer através da supressão de fatores pró-angiogênicos, quer através da promoção de atividade anti-angiogênica endógena. Como resultado, a estrutura e função dos vasos tumorais torna-se mais normal: ficam mais maduros, com maior revestimento por células perivasculares, um fluxo sanguíneo mais homogêneo, permeabilidade e hipóxia reduzidas e, mais importante, um aporte mais uniforme de terapias antitumorais administradas sistemicamente (Goel et al., 2012).

De fato, estudos para testar os efeitos dos fármacos anti-angiogênicos vieram demonstrar a existência de uma “janela de normalização” – um período de tempo que se inicia com o aparecimento de um fenótipo vascular normalizado (tipicamente 1 a 2 dias após o início do tratamento) e que termina quando as características de normalização são perdidas (Batchelor et al., 2007; Rakesh K. Jain, 2005; Kamoun et al., 2009; Tong et al., 2004; Winkler et al., 2004). O encerramento desta janela pode ser causado por uma dose excessivamente elevada ou prolongada do anti-angiogênico (pendendo novamente o equilíbrio a favor dos fatores anti-angiogênicos, conduzindo consequentemente a regressão vascular), ou pelo desenvolvimento

de resistência à terapia anti-angiogénica, através da qual os tumores conseguem recrutar vasos por vias alternativas (Figura 3) (Goel et al., 2012).

Figura 3 - Terapia anti-angiogénica baseada na normalização vascular. Num tecido normal, os sinais a jusante das moléculas pró-angiogénicas, como VEGF e Angiopoietina 2 (Ang2), são rigorosamente compensados pelos que resultam das moléculas anti-angiogénicas como sVEGF-R1, trombospondinas e semaforinas. Por isso, os vasos sanguíneos exibem uma função e estrutura normais (painel 1). Pelo contrário, devido a alterações genéticas e epigenéticas, o equilíbrio pode pender a favor da formação de novos vasos no tumor. Consequentemente, os vasos tumorais são altamente anormais tanto estrutural como funcionalmente (painel 2). Isto cria um microambiente hostil nos tumores – caracterizado por hipóxia, acidose e aumento da pressão do fluido intersticial – o que catalisa a progressão tumoral e a resistência ao tratamento por intermédio da instabilidade genómica, angiogénese, supressão imunitária, inflamação, resistência à morte celular, entre outros. Quando um fator pró-angiogénico, como o VEGF, é neutralizado com um anticorpo, como o bevacizumab (ou outra molécula anti-VEGF), os vasos sanguíneos anormais são eliminados e os que não são eliminados acabam por ser remodelados, o que resulta numa vasculatura normalizada (painel 3). Esta normalização pode conduzir a uma redução da hipóxia tumoral e da pressão do fluido intersticial, permitindo obter melhores resultados com a quimio- ou radioterapia e também com a terapia imunitária. Se o agente anti-angiogénico for demasiado potente, ou a sua dose demasiado elevada, o equilíbrio entre os fatores pode pender na outra direção e causar eliminação excessiva de vasos. Esta eliminação excessiva, inadequada, resulta na regressão tumoral e/ou aumento da hipóxia (painel 4 superior). Contudo, o aumento da hipóxia pode resultar na redução da eficácia de outros tipos de terapia e pode também desencadear a invasão e metastização. Alternativamente, os tumores podem usar outras moléculas pró-angiogénicas e recomeçar a formação de vasos sanguíneos anormais (painel 4 inferior). Por isso, tem sido desenvolvido um intenso esforço no sentido de identificar e caraterizar mais fatores pró-angiogénicos que possam ser alvo de novas terapias anti-angiogénicas. Traduzido e adaptado de (Rakesh K. Jain & Carmeliet, 2012).



Durante a anti-angiogénese, a maturação dos vasos (formação de vasos com uma parede endotelial mais impermeável) como consequência do maior revestimento por perícitos, resulta na redução da pressão do fluido intersticial e numa melhor perfusão tumoral que aumenta o aporte de agentes quimioterapêuticos e a sensibilidade a estes. Concomitantemente, os vasos tumorais diminuem em número por causa do efeito direto do tratamento anti-angiogénico sobre as células endoteliais (Bellou et al., 2013).

Deste modo, as terapias administradas durante a janela de normalização, podem alcançar uma maior eficácia (Rakesh K. Jain, 2001). Esta hipótese, apesar de controversa, oferece uma

potencial explicação para o porquê de o bevacizumab poder melhorar o resultado da quimioterapia e, mais importante, oferece linhas orientadoras para melhorar tais terapias de combinação (Rakesh K. Jain, Duda, Clark, & Loeffler, 2006).

Outras hipóteses, não mutuamente exclusivas, também oferecem potenciais razões para combinar AAs com a quimioterapia (Carmeliet & Jain, 2011a). Por exemplo, alguns AAs podem eliminar diretamente as células neoplásicas e sensibilizar as células endoteliais para os fármacos citotóxicos. Adicionalmente, como vimos, por se encontrarem em proliferação ativa, os agentes antitumorais convencionais podem também eliminar diretamente as células endoteliais associadas aos vasos tumorais. Por fim, a eliminação de células neoplásicas e de outros tipos celulares presentes no estroma por AAs e/ou citotóxicos pode levar à descompressão temporária dos vasos sanguíneos tumorais, resultando numa melhor perfusão vascular. Alternativamente, a perfusão reduzida causada por uma “poda” excessiva dos vasos sanguíneos, pode bloquear ou reduzir a eliminação (*clearance*) dos fármacos antitumorais que acabam por se acumular no tumor (Rakesh K. Jain, 2014).

Ao mesmo tempo que é responsável por originar vasos sanguíneos completamente maduros e perfundidos que podem melhorar o aporte das terapia ao tecido tumoral, a normalização vascular também acarreta a promessa de levar à redução da metastização (Carmeliet & Jain, 2011a; Rakesh K. Jain, 2005; Leite de Oliveira et al., 2012).

Apesar de a normalização dos vasos tumorais aumentar o aporte de oxigénio e nutrientes às células neoplásicas, os dados pré-clínicos disponíveis indicam que os agentes de normalização só induzem um aumento do crescimento tumoral em alguns casos (Hamzah et al., 2008; Stockmann et al., 2008). A maior parte dos estudos pré-clínicos revela que não existe alteração ou que apenas se verifica uma redução moderada a substancial na taxa de crescimento tumoral (Falcón et al., 2009; Kamoun et al., 2009; Massimiliano Mazzone et al., 2009; Nassare, Gemmill, & Drabkin, 2014; Rolny et al., 2011; Tong et al., 2004; Van de Veire et al., 2010; Winkler et al., 2004). Enquanto alguns vasos se tornam normais, outros são “podados” ou eliminados e os restantes permanecem inalterados. O aumento da proliferação das células neoplásicas em redor dos vasos normalizados pode assim ser compensada ou mesmo contrariada pela maior eliminação (por apoptose) de células neoplásicas que se encontravam em redor dos vasos que foram “podados”, sendo o resultado final a inibição do crescimento tumoral (Carmeliet & Jain, 2011b).

Hoje, a normalização do microambiente tumoral, através da reparação da função dos vasos tumorais, é considerada uma estratégia promissora para abrandar a progressão tumoral e melhorar o aporte tumoral de fármacos citostáticos (Rakesh K. Jain, 2014).

Para induzir a normalização vascular nos tecidos, a maior parte dos estudos clínicos e pré-clínicos tem recorrido a inibidores farmacológicos diretos da angiogénese tumoral, isto é, agentes que inibem moléculas pró-angiogénicas. As suas ações podem prevalecer quer nas células endoteliais, quer nas células perivasculares/murais envolvidas na maturação vascular (Ehling & Mazzone, 2016; Goel et al., 2011). Contudo, estão também descritos mecanismos indiretos de inibição da angiogénese. Os AAs indiretos frequentemente inibem vias responsáveis por dirigir a proliferação das células neoplásicas que estão coincidentemente a montante de vias de sinalização pro- ou anti-angiogénicas (Vogelstein & Kinzler, 2004). Exemplos de tais agentes incluem os inibidores dos oncogenes das células neoplásicas, terapias endócrinas para tumores dependentes de hormonas sexuais e agentes usados na quimioterapia metronómica (Goel et al., 2012).

Com centenas de ensaios clínicos, em múltiplas indicações tumorais e estádios patológicos, a decorrer, e dúzias de agentes anti-VEGF e ainda de outros agentes dirigidos para alvos envolvidos noutras vias angiogénicas já em ensaios experimentais ou clínicos, uma questão urgente é compreender porque é que a maioria dos pacientes deixa de responder – ou não responde desde o início – a tais fármacos e como é que tais limitações podem ser ultrapassadas (Ebos & Kerbel, 2011).

Estes dados emergentes sugerem que, para melhorar a sobrevivência geral dos pacientes oncológicos, será necessário um uso mais personalizados dos agentes anti-angiogénicos (AA) existentes, descobrir novos AAs e ainda, desenvolver novos agentes atenuadores da hipóxia (Rakesh K. Jain, 2014).

2.1.2.1. Terapia anti-VEGF

2.1.2.1.1. Via de sinalização VEGF

Em 1983 foi isolada uma proteína com forte atividade indutora de permeabilidade vascular e designada de fator de permeabilidade vascular (VPF – *Vascular Permeability Factor*) (Senger et al., 1983). Alguns anos mais tarde, outros autores purificaram uma proteína com atividade promotora do crescimento das células endoteliais vasculares e designaram-na por VEGF (Ferrara & Henzel, 1989). Surpreendentemente, a clonagem molecular revelou que as duas proteínas eram idênticas e eram codificadas por um único gene, atualmente conhecido por *Vegf* (ou *Vegf-A*) (Shibuya, 2008).

“VEGF” é a designação dada quer ao membro protótipo da família, o VEGF-A, quer à família de cinco polipéptidos homodiméricos, estruturalmente relacionados, com 40 kDa: VEGF-A, -B, -C, -D e o PlGF (Kawamura, Li, Welsh, & Claesson-Welsh, 2008).

Codificado por um único gene com oito exões, *VegfA* é clivado alternativamente para gerar quatro isoformas (Kawamura et al., 2008). As isoformas mais abundantes parecem ser VEGF-A₁₂₁ e VEGF-A₁₆₅. VEGF-A₁₆₅, mas não VEGF-A₁₂₁, liga-se ao proteoglicano heparano-sulfato (HSPG – *Heparan Sulfate ProteoGlycan*) da superfície celular, o que resulta na retenção parcial de VEGF-A₁₆₅ enquanto que VEGF-A₁₂₁ é totalmente libertada. VEGF-A₁₆₅ é um mitogéneo celular mais potente do que VEGF-A₁₂₁ (Soker, Takashima, Miao, Neufeld, & Klagsbrun, 1998).

Além de ser regulado a nível pós-transcricional, por clivagem alternativa e por processamento extracelular (por ação de metaloproteinases da matriz, que o libertam da sua ancoragem à matriz extracelular e o tornam solúvel) (S. Lee, Jilan, Nikolova, Carpizo, & Luisa Iruela-Arispe, 2005), o VEGF-A é ainda regulado a nível transcricional. Os fatores de crescimento que operam por via dos fatores de transcrição como o complexo Fos/Jun e o fator nuclear κ B (NF- κ B) e hormonas como o estrogénio, parecem ser os principais estimuladores da expressão genética de VEGF-A em condições de normóxia. O stress hipóxico bloqueia a função do von Hippel-Lindau (VHL), um componente do sistema ubiquitina ligase, e estabiliza o complexo do fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF – *Hypoxia-Inducible transcription Factor*) HIF α /HIF β . Este complexo liga-se a elementos responsivos a hipóxia (HRE – *Hypoxia-Responsive Elements*) na sequência do gene *VegfA* e induz o aumento da sua transcrição. As condições hipóxicas conduzem ainda ao aumento da estabilidade do ARNm pós-transcricionalmente, resultando na produção de mais proteína VEGF-A (Shibuya, 2008).

A expressão do VEGF-A é assim regulada positivamente sobretudo por hipóxia, sendo por isso a resposta angiogénica rapidamente iniciada em situações de menor tensão de O₂ durante o desenvolvimento, crescimento e doença (Herbert & Stainier, 2011).

Os ligandos VEGF ligam-se com diferentes especificidades a três, maioritariamente endoteliais, recetores tirosina-cinase (TK – *Tyrosine-Kinase*): VEGF-R1/*fms-like tyrosine kinase 1 (Flt1)*, VEGF-R2/*mouse foetal liver kinase 1 (Flk1)* e VEGF-R3/*fms-like tyrosine kinase 4 (Flt4)* (Lohela, Bry, Tammela, & Alitalo, 2009).

VEGF-A pode ligar-se a VEGF-R1 e VEGF-R2. As isoformas de VEGF-A ligadas a heparina também interagem com um co-recetor, a neuropilina 1 (Nrp1), resultando na potenciação da sinalização por VEGF-R2. O PlGF e VEGF-B ligam-se seletivamente ao VEGF-R1. VEGF-C e VEGF-D interagem primariamente com VEGF-R3 e estimulam a linfangiogénese (Chung, Lee, & Ferrara, 2010).

O VEGF-A é o principal regulador da angiogénese fisiológica e patológica. Este fator de crescimento é essencial não só à vasculogénese mas também à angiogénese (Shibuya, 2008).

Durante a angiogénese, o VEGF-A liga-se ao seu recetor relacionado VEGF-R2 e ativa múltiplas vias de sinalização a jusante por meio de intermediários de sinalização como as proteínas cinase ativadas por mitogénios (MAPKs – *Mitogen-Activated Protein Kinases*), fosfoinosítido 3-cinases (PI3Ks – *PhosphoInositide 3 Kinases*), AKT (proteína cinase específica da serina/treonina), fosfolipase C γ e pequenas GTPases. Como resultado, a sinalização por VEGF promove proliferação das células endoteliais, extensão dos *filopodia* das células-ponta, degradação da matriz extracelular (MEC) e quimiotaxia. Consequentemente, é a sinalização por VEGF-A que induz a motilidade e o comportamento invasivo necessário ao brotamento das células-ponta e ativa o “interruptor” angiogénico (Herbert & Stainier, 2011).

O VEGF-A é também um potente fator de sobrevivência para as células endoteliais durante a angiogénese fisiológica e tumoral e foi já demonstrado que induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas nas células endoteliais (Tammela, Enholm, Alitalo, & Paavonen, 2005).

Este fator de crescimento foi originalmente descrito como um fator de permeabilidade, por desencadear a formação de *gaps* intercelulares, organelos vesico-vasculares, vacúolos e fenestrações (Tammela et al., 2005). O VEGF causa ainda vasodilatação através da indução da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) e do consequente aumento da produção de óxido nítrico (Tammela et al., 2005).

A libertação parácrina do VEGF-A, por células tumorais, mieloides e outras células do estroma, conduz ao aumento da ramificação vascular e torna os vasos tumorais anormais. Por outro lado a libertação autócrina de VEGF-A pelas células endoteliais, mantém a homeostasia vascular (Carmeliet & Jain, 2011a).

VEGF e os seus recetores são também cruciais para a mobilização de células progenitoras endoteliais (EPCs – *Endothelial Progenitor Cells*) a partir da medula óssea e para o seu recrutamento para locais específicos do organismo; em ambos os processos, a expressão e sinalização por VEGF-R1 nas EPCs tem funções essenciais apesar de a sinalização por este mesmo recetor inibir a angiogénese durante a embriogénese (R. H. Adams & Alitalo, 2007).

No murganho, Flk1 (VEGF-R2) é o marcador molecular mais precoce das células progenitoras dos sistemas vascular e hematopoiético, sendo a sinalização ativa por VEGF-A necessária para a formação de ambos os sistemas (Coultas, Chawengsaksophak, & Rossant, 2005).

O resultado da sinalização pelo VEGF-R2 ativado pelo VEGF-A₁₆₅ é distinto do induzido pelas isoformas solúveis. Na MEC, o VEGF-A₁₆₅ (VEGF-A₁₆₄ no murganho) forma gradientes que promovem a extensão dos *filopodia*, a migração direcionada das células endoteliais e a ramificação dos vasos sanguíneos em padrões vasculares primários. Pelo contrário, VEGF-A₁₂₁ (VEGF-A₁₂₀ no ratinho), incapaz de se ligar ao heparano-sulfato, apresenta-se distribuído livremente numa forma solúvel e influencia a proliferação, mas não a migração, de células

endoteliais. Além disso, as variantes de clivagem do VEGF-A com terminais carboxílicos alterados (isoformas b) possuem capacidade muito reduzida para ativar o VEGF-R2. Assim, a rigorosa regulação espacial da produção de isoformas de VEGF-A distintas é um ponto-chave no controlo da morfogénese dos vasos sanguíneos (Carmeliet & Jain, 2011a; Herbert & Stainier, 2011).

A maior expressão de VEGF-R2 nos *filopodia* das células-ponta sugere que este recetor está implicado na protrusão destas extensões mediada pelo VEGF. Deste modo, a migração das células-ponta depende da distribuição, enquanto a proliferação das células-caule depende da concentração da atividade agonista do VEGF-R2. A ativação do VEGF-R2 é assim interpretada de forma diferente pelas células-ponta e pelas células-caule (Gerhardt et al., 2003).

As células-ponta adotam um fenótipo proteolítico e começam a quebrar a membrana basal (MB). Como resultado, as células endoteliais perdem o contacto com a laminina da MB e ficam expostas ao colagénio intersticial. Esta mudança ajuda a desencadear cascatas de sinalização nas células endoteliais que são responsáveis pela reorganização do citoesqueleto e morfogénese do brotamento. A metaloproteinase da matriz tipo 1 membranar (MT1-MMP – *Membrane Type 1-Matrix Metaloproteinase*), que é expressa pela célula-ponta de um brote endotelial, abre a matriz circundante e mais tarde, quando as células-caule entram em contacto com os perícitos, é reprimida. Moléculas de MT1-MMP expressas na superfície das células endoteliais são também necessárias para a etapa subsequente da cascata angiogénica, a formação de túbulos. Estas proteinases desempenham também um papel importante na lumenização por formação de vacúolos intracelulares (Chung et al., 2010; S. Lee et al., 2005).

Durante a embriogénese mamífera, o gene *Flt1* (*VEGF-R1*) é essencial ao normal desenvolvimento dos vasos sanguíneos e murganhos mutantes sem *Flt1* (*Flt1*^{-/-}) morrem devido ao sobrecrecimento e desorganização dos vasos sanguíneos (Fong, Rossant, Gertsenstein, & Breitman, 1995).

O VEGF-R1 tem maior afinidade para o VEGF-A do que o VEGF-R2, contudo, a atividade cinase do VEGF-R2 é superior à do VEGF-R1 (Shibuya, 2008). O VEGF-R1 é por isso considerado um recetor *decoy* (engodo) que contraria a sinalização pró-angiogénica. Além disso, a clivagem alternativa do VEGF-R1 origina uma isoforma secretada, cataliticamente inativa – sVEGF-R1 (*soluble* VEGF-R1) – que sequestra o VEGF-A livre (Herbert & Stainier, 2011).

O papel do VEGF-R1 é complexo e, dependendo do contexto, pode induzir: a regulação negativa da sinalização por VEGF-R2 através do sequestro de VEGF-A, a migração de monócitos e a libertação parácrina de proteases ou fatores de crescimento pelas células endoteliais (Chung et al., 2010).

Ao contrário do VEGF-R2, o VEGF-R1 é predominantemente expresso nas células-caule e está envolvido na orientação e limitação da formação de células-ponta (Potente et al., 2011).

Estudos recentes indicam que o VEGF-R1 afeta a proliferação das células endoteliais, morfogênese vascular e até a orientação de células-ponta primariamente através da sua isoforma solúvel de um modo autônomo não-celular (Chappell, Taylor, Ferrara, & Bautch, 2009; Kappas et al., 2008). Regiões com pouco VEGF-R1 teoricamente terão concentrações mais elevadas de VEGF-A livre e as células dessas regiões terão assim mais VEGF-A disponível para ativação do VEGF-R2. O gene *Flt1* é proeminentemente regulado pela sinalização Notch e os níveis de *Flt1* afetam profundamente a competição pela função de célula-ponta, com as células que expressam menos *Flt1* a dominar a posição de célula-ponta (Jakobsson et al., 2010).

VEGF-C, é outro determinante emergente do desenvolvimento vascular. A ativação do VEGF-R3 (codificado por *Flt4*) por esta isoforma, desempenha importantes funções na linfangiogênese e está também envolvida na regulação positiva da angiogênese. Este recetor apresenta expressão elevada nas células-ponta e é necessário ao brotamento angiogénico no ratinho e no peixe-zebra (Herbert & Stainier, 2011; Tammela et al., 2008). Este recetor tem modos de sinalização “ativa” (dependente de ligando e pró-angiogénica) e “passiva” (independente de ligando e anti-angiogénica). O modo passivo é mediado pela ativação da sinalização Notch (Tammela et al., 2012).

O VEGF-C derivado dos macrófagos, ativa o VEGF-R3 nas células-ponta para reforçar a sinalização Notch, o que contribui para a conversão fenotípica das células endoteliais nos pontos de fusão dos brotes vasculares (Tammela et al., 2012), contudo, em células endoteliais com pouca ou nenhuma atividade de sinalização Notch, a sinalização por VEGF-R3 é pró-angiogénica (Benedito et al., 2012; Tammela et al., 2008).

Um estudo recente veio salientar o papel fundamental da sinalização pelo VEGF-R2 na proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração das células endoteliais e destacar o papel central do VEGF-R2 no brotamento vascular mediado por Notch (Zarkada, Heinolainen, Makinen, Kubota, & Alitalo, 2015). Utilizando linhas de murganhos mutantes para o VEGF-R2 e VEGF-R3, induzíveis e endoteliais específicas, para contornar a questão da letalidade embrionária resultante da deleção genética simultânea destes dois recetores, os autores analisaram a angiogénese na retina após induzir a perda-de-função de ambos os recetores nos murganhos recém-nascidos (Zarkada et al., 2015).

Os resultados obtidos contrastam com os previamente publicados por Benedito e colegas (2012). Neste estudo, Zarkada (2015) implica o VEGF-R2 na sobre-regulação do ligando *Delta-like 4* (Dl4) e da sinalização Notch, mas não consegue confirmar que o VEGF-R3 atua como supressor do brotamento mediado por Notch. Os diferentes resultados obtidos pelos dois autores

podem ser atribuídos a uma deleção incompleta do VEGF-R2 e à especificidade do inibidor de tirosina cinases que foi utilizado para inativar o VEGF-R3 nos estudos de Benedito (2012). O VEGF-R2 é absolutamente necessário para o brotamento de novos vasos. Mais, a indução da atividade do VEGF-R3 não conseguiu resgatar o brotamento angiogénico quando a atividade da via Notch é inibida. De fato, a gravidade do fenótipo vascular é dependente da dose do VEGF-R2 e quantidades residuais do VEGF-R2 conseguem suportar a angiogénese (Zarkada et al., 2015).

Além dos VEGF-Rs, as células endoteliais e linfáticas expressam também as proteínas de membrana neuropilina-1 e -2 (Nrp1 e Nrp2), respetivamente, que funcionam como co-recetores para a família VEGF (Shibuya, 2008).

Nrp1 liga-se a VEGF-A, VEGF-B e PlGF. Nrp2 liga-se a VEGF-A, VEGF-C e PlGF. A Nrp1 atua como co-recetor potenciando as interações VEGF/VEGF-R2, formando complexos com VEGF-R1 e aumentando a angiogénese tumoral *in vivo* (Tammela et al., 2005).

O fator de crescimento placentário (PlGF) é predominantemente expresso na placenta, coração e pulmões. Originalmente descoberto como um homólogo do VEGF, esperava-se que o PlGF fosse também um fator angiogénico fundamental, contudo, ao contrário do VEGF, o PlGF é dispensável para o desenvolvimento e apenas relevante em situações de doença (Carmeliet & Jain, 2011a; Dewerchin & Carmeliet, 2012).

O PlGF liga-se apenas a ambas as isoformas do VEGF-R1 (Kendall & Thomas, 1993) e promove a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais (Adini, Kornaga, Firoozbakht, & Benjamin, 2002; Carmeliet et al., 2001; C. Fischer et al., 2007; Schmidt et al., 2011; Ziche et al., 1997) através de efeitos diretos nas células endoteliais e murais, mas também através de efeitos indiretos nas células não-vasculares com atividade pró-angiogénica (Dewerchin & Carmeliet, 2012).

Uma vez que o VEGF-R1 ancorado à membrana funciona como um recetor “engodo” (*ligand trap*), por ter elevada afinidade para o VEGF, mas fraca atividade tirosina cinase (Park, Chen, Winer, Houck, & Ferrara, 1994), o PlGF acaba por estimular a proliferação das células endoteliais indiretamente por substituir o VEGF na ligação ao VEGF-R1, deixando assim mais VEGF livre para ativar o VEGF-R2 (Park et al., 1994). O PlGF pode ainda exercer o seu efeito pró-angiogénico por sobre-regular a expressão de outros fatores angiogénicos como o VEGF, o bFGF (ou FGF2), o PDGF-B e metaloproteinases da matriz (MMPs – *Matrix MetalloProteinases*), entre outras moléculas (Marcellini et al., 2006; Roy et al., 2005). Além disso, a ativação do VEGF-R1 pelo PlGF induz um diálogo intermolecular FLT1:VEGF-R2 que amplifica a sinalização VEGF/VEGF-R2, sugerindo que as células endoteliais têm capacidade para aumentar a sua responsividade ao VEGF libertando PlGF (Autiero et al., 2003).

Uma vez que PlGF e VEGF induzem a fosforilação de resíduos de tirosina diferentes no VEGF-R1 a ativação deste recetor por PlGF induz vias de sinalização diferentes das induzidas por VEGF (Autiero et al., 2003), justificando a transmissão de sinais angiogénicos distintos através do VEGF-R1 por estes dois ligandos (Dewerchin & Carmeliet, 2012).

Contudo, alguns dos efeitos pró-angiogénicos permanecem discutíveis (Dewerchin & Carmeliet, 2012). Devido à menor atividade TK do VEGF-R1, o PlGF tem apenas um efeito limitado na angiogénese *in vitro* (Park et al., 1994) e foi demonstrado que o PlGF pode inibir a angiogénese tumoral quando é expresso em níveis suprafisiológicos por células neoplásicas que também expressam VEGF. Nestas circunstâncias, formam-se heterodímeros VEGF:PlGF em vez dos homodímeros mais angiogénicos VEGF:VEGF, o que pode explicar a reduzida atividade angiogénica destas células neoplásicas (Eriksson et al., 2002; Schomber et al., 2007; L. Xu et al., 2006).

2.1.2.1.2. Inibidores da sinalização VEGF

A demonstração de que o VEGF é o principal fator de sobrevivência das células endoteliais, despoletou diversos estudos pré-clínicos que têm usado diferentes tipos de abordagens, para inibir o crescimento tumoral, incluindo: (1) o bloqueio específico do VEGF com agentes de alto peso molecular (como anticorpos ou fragmentos de recetor (*receptor bodies*)) que interferem com a ligação do VEGF aos respetivos recetores endógenos ou com a sua sinalização a jusante (Ferrara, 2002) e (2) a inibição da função do VEGF-R2 com moléculas de baixo peso molecular (como inibidores da tirosina cinase (TKIs) e péptidos). A primeira classe inclui os anticorpos anti-VEGF humano (como o A4.6.1, a IgG murina anti-VEGF humano que foi a precursora do bevacizumab), o bevacizumab, anticorpos anti-VEGF-A murino e o VEGF-Trap aflibercept (uma proteína de fusão que se liga e sequestra todas as isoformas de VEGF e PlGF). A segunda classe inclui os anticorpos anti-VEGF-R2 como o DC101 ou os inibidores dos recetores tirosina cinase (TKIs – *Tyrosine Kinase Inhibitors*) que inibem o domínio cinase dos VEGF-Rs. Os TKIs competem especificamente com local de ligação do ATP no domínio catalítico dos recetores tirosina cinase e têm um espectro de atividade inibitória muito variável, e por vezes promíscuo, inibindo outros recetores além dos VEGF-Rs (como os recetores do PDGF (PDGF-Rs), e c-kit) (Goel et al., 2012).

Em 1996, a primeira evidência de normalização vascular em resposta ao bloqueio de VEGF foi revelada em tipos tumorais humanos implantados em murganhos. Tanto o diâmetro como a tortuosidade vascular, juntamente com a permeabilidade, foram fortemente reduzidos após a administração de uma única dose de A4.6.1. Contudo, caso a terapia fosse continuada, as características de normalização eram rapidamente substituídas por uma marcada regressão

vascular, provavelmente devido a uma neutralização excessiva da atividade do VEGF. Estas foram as primeiras evidências de que a neutralização do VEGF, derivado das células neoplásicas, pode reverter, ainda que transitoriamente, algumas das anomalias da microvasculatura tumoral (F. Yuan et al., 1996). Alterações estruturais como a menor densidade vascular têm sido consistentemente observados após a terapia com anticorpos anti-VEGF e com aflibercept numa grande variedade de modelos tumorais (Dickson et al., 2007; Hansen-Algenstaedt et al., 2000; Inai et al., 2004; Juan et al., 2009; C. G. Lee et al., 2000; Tong et al., 2004; Wildiers et al., 2003). Esta menor densidade vascular tem sido normalmente acompanhada por um aumento na maturidade vascular (proporção de vasos revestidos por células perivasculares), de tal modo que a vasculatura tumoral tratada se assemelha mais à dos tecidos normais (Dickson et al., 2007; Inai et al., 2004; Tong et al., 2004; F. Yuan et al., 1996). Nalguns estudos outras características anómalas dos vasos tumorais – como a membrana basal irregular e desorganizada – apresenta-se também normalizada após a terapia anti-VEGF (Kamoun et al., 2009; Tong et al., 2004; Winkler et al., 2004).

Tais estudos salientaram a presença de uma “janela de normalização” e enfatizaram a sua importância terapêutica. Em muitos casos, a normalização após o bloqueio de VEGF não é notada durante horas a dias após o início da terapêutica e tem uma curta duração (7 a 10 dias). É durante esta “janela” temporal que existe uma maior sensibilidade à radioterapia e que, consequentemente, se consegue um melhor controlo tumoral (Winkler et al., 2004). Outros grupos demonstraram princípios semelhantes com a quimioterapia, obtendo melhor controlo tumoral com a combinação de citotóxicos com agentes anti-VEGF de um modo dependente da calendarização do tratamento (Goel et al., 2012).

O bevacizumab (Avastin[®], Genentech, Inc.) foi o primeiro fármaco anti-angiogénico aprovado pela FDA em 2004 como um tratamento de primeira linha para pacientes com cancro colorrectal metastático (Hurwitz et al., 2004). Hoje em dia, o seu uso está recomendado em combinação com quimioterapia para tratar o cancro colorrectal metastático e o cancro do pulmão NSC (*Non-Small-Cell*); em combinação com interferão- α para tratar o cancro renal metastático e como agente único no glioblastoma recorrente. Combinado com a quimioterapia o bevacizumab aumenta significativamente a sobrevivência geral (*overall survival*) de pacientes com cancro colorrectal metastático (Ebos & Kerbel, 2011).

O ziv-aflibercept (Zaltrap[®], Sanofi and Regeneron Pharmaceuticals, Inc.) é uma proteína de fusão recombinante que integra as regiões de ligação ao VEGF dos domínios extracelulares dos recetores 1 e 2 do VEGF humanos ligados à porção Fc da imunoglobulina humana IgG1. Funciona por competição com os VEGF-Rs endógenos para a ligação ao VEGF-A, VEGF-B e

PIGF. Foi aprovado pelo FDA em 2012 para utilização em combinação com quimioterapia no tratamento do cancro colorectal metastático (Sennino & McDonald, 2012).

Moléculas de baixo peso molecular que funcionam como inibidores da tirosina-cinase (TKIs) dos VEGF-Rs foram também desenvolvidas. Atualmente existem sete TKIs aprovados como AAs: axitinib (Inlyta[®]), cabozantinib (Cometriq[®]), pazopanib (Votrient[®]), regorafenib (Stivarga[®]), sorafenib (Nexavar[®]), sunitinib (Sutent[®]), e vandetanib (Caprelsa[®]). Podem ser prescritos para utilização em combinação com citostáticos no tratamento de diferentes tipos de cancro (Gacche & Meshram, 2014). O sorafenib, sunitinib e o pazopanib foram já sujeitos a extensos ensaios clínicos; estes TKIs demonstraram ter atividade suficiente como agentes únicos devendo a sua aprovação ser regulamentada para utilização no carcinoma de células renais (sunitinib, pazopanib), em tumores do estroma gastrointestinal (sunitinib) e no carcinoma hepatocelular (sorafenib) (Ainsworth, Lee, & Eisen, 2009; Llovet et al., 2008; Motzer et al., 2007; A. X. Zhu & Raymond, 2009).

Os TKIs são totalmente diferentes dos anticorpos. Primeiro, os TKIs inibem diretamente o domínio tirosina cinase dos VEGF-Rs e não interferem com a ligação de ligandos da família VEGF aos respetivos recetores. Segundo, apresentam frequentemente um largo espectro de atividade, inibindo diversas cinases simultaneamente e com diferentes potências. Como inibem outras cinases ativas numa diversidade de tipos celulares incluindo as próprias células neoplásicas, tem sido difícil determinar em que medida o benefício clínico obtido com estes fármacos se relaciona com os seus efeitos anti-angiogénicos (Goel et al., 2011). As alterações estruturais na vasculatura tumoral após a terapia anti-angiogénica com TKIs são geralmente consistentes com as que se seguem ao tratamento com anticorpos. Contudo, os mecanismos moleculares precisos são mais difíceis de estabelecer, dada a promiscuidade da inibição. Por exemplo, ainda não foi totalmente esclarecido o impacto da inibição do PDGF-R, juntamente com o bloqueio dos VEGF-Rs, na normalização vascular, dada a importância do PDGF-R no recrutamento de células perivasculares e na maturação vascular (Goel et al., 2011).

Apesar do VEGF ser sobre-expresso pela maioria dos tumores sólidos, é também essencial ao desenvolvimento dos vasos sanguíneos normais. A ampla expressão do VEGF e dos seus recetores em tecidos normais significa que as redes vasculares normais podem também ser afetadas por este tipo de terapias, conduzindo ao desenvolvimento de efeitos adversos. Contudo, o grau desta inibição é dependente da especificidade do tipo de inibidor (Siemann, 2011). Por outro lado, pode ser difícil, se não mesmo impossível, perspetivar uma modelação fina e precisa do crescimento endotelial apenas durante a “janela de normalização vascular” para cada paciente e tipo tumoral, com estes agentes (Ehling & Mazzone, 2016; Goel et al., 2011).

2.1.2.2. Terapia anti-Notch

2.1.2.2.1. Via de sinalização Notch

A via de sinalização Notch encontra-se evolutivamente conservada desde organismos mais simples como a *Drosophila* (onde foi descrita pela primeira vez) até aos humanos (Sainson & Harris, 2008).

Notch designa um recetor de superfície celular que transduz sinais de curto alcance, por interação com ligandos transmembranares em células vizinhas (Kopan, 2012).

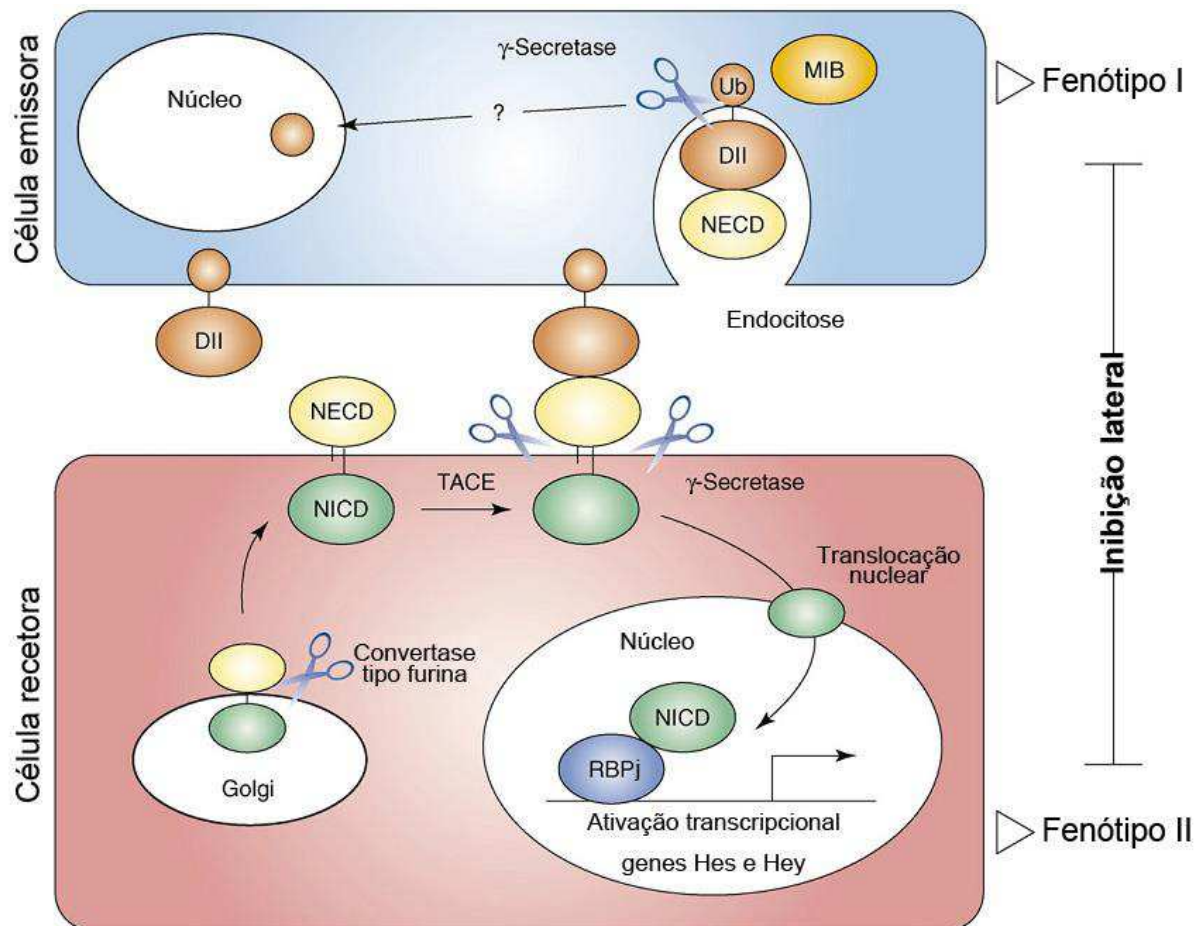
Esta via de sinalização é necessária ao normal desenvolvimento embrionário, à regulação da homeostasia dos tecidos e à manutenção de células estaminais nos adultos (Phng & Gerhardt, 2009). Estes recetores e ligandos transmembranares são expressos em diferentes combinações na maior parte, se não mesmo em todos, os tipos celulares (Sainson & Harris, 2008).

A sinalização Notch é uma forma de comunicação intercelular, permitindo a um pequeno grupo de células semelhantes integrar informação contextual e discernir vias separadas de diferenciação (G. Thurston & Kitajewski, 2008). A via de sinalização Notch regula a determinação do destino celular e a proliferação e sobrevivência de células vizinhas, de acordo com a sua capacidade para expressar ou os recetores ou os ligandos da via, através da “inibição lateral” (Sainson & Harris, 2008).

A “inibição lateral” envolve a apresentação de um ligando Notch (Delta ou Jagged) a um recetor Notch numa célula adjacente, resultando na ativação da sinalização Notch numa célula e supressão nas células adjacentes (Figura 4). O resultado final compromete as células a destinos celulares diferentes: um, promovido pela ativação de Notch e outro dependente da ausência de sinalização Notch (G. Thurston & Kitajewski, 2008).

Os recetores Notch são uma classe distinta de recetores por atuarem quer na superfície celular, onde se ligam ao ligando, quer no interior do núcleo onde funcionam como moduladores transcricionais. Nos mamíferos existem quatro recetores Notch, designados Notch1 a Notch4 (G. Thurston & Kitajewski, 2008).

Figura 4 - Representação esquemática da via de sinalização Notch. O recetor Notch é pré-clivado no aparelho de Golgi e é dirigido subsequentemente para a membrana plasmática da célula recetora onde interage com os respetivos ligandos localizados na superfície de uma célula emissora vizinha. A interação recetor-ligando resulta numa alteração conformacional do recetor que permite as clivagens adicionais pela TACE (enzima conversora do fator de necrose tumoral α) e pelo complexo γ -secretase. Este processamento proteolítico liberta o domínio intracelular de Notch (NICD) que é translocado para o núcleo onde interage com complexos com RBPj (*Recombination signal sequence-Binding Protein for immunoglobulin- κ J*) e ativa a transcrição de genes alvo (como a família *Hes* e *Hey* de repressores transcripcionais). A ubiquitinação (Ub) do domínio intracelular do ligando por *mindbomb* (Mib) induz a endocitose do ligando e do domínio extracelular de Notch (NECD) na célula emissora, onde pode ser (?) iniciada sinalização adicional. De um modo geral, quando ativada, a sinalização Notch permite a células vizinhas adquirir um fenótipo distinto (fenótipo I vs fenótipo II), através de um processo designado de inibição lateral. Traduzido e adaptado de (Sainson & Harris, 2007).



Estes recetores são glicoproteínas transmembranares tipo I, codificados por um único precursor, que se converte num heterodímero ligado de forma não-covalente. Estruturalmente este heterodímero consiste num fragmento N-terminal extracelular (NECD – *Notch ExtraCellular Domain*), numa subunidade C-terminal transmembranar-intracelular (NTMD – *Notch TransMembrane Domain*) e num domínio intracelular (NICD – *Notch IntraCellular Domain*) que é translocado para o núcleo após ativação do recetor por um ligando, para mediar a ativação de genes específicos (Ntziachristos et al., 2014).

No NECD as repetições tipo EGF (*Epidermal Growth Factor*) são responsáveis pela ligação dos ligandos e as repetições LIN12-Notch previnem a ativação prematura do recetor (Collu, Hidalgo-Sastre, & Brennan, 2014).

Apesar das semelhanças globais entre recetores, diferenças nos domínios de ligação do NECD e nos domínios de transativação intracelular, são responsáveis por afinidades distintas para os ligandos e diferente capacidade para ativar a transcrição a jusante (Ntziachristos et al., 2014).

A interação de um recetor Notch com um dos ligandos é regulada ao nível da glicosilação do recetor. A presença e o tipo de glicanos O-fucose no recetor Notch influenciam a ligação a ligandos Delta ou Jagged, sugerindo um meio pelo qual um ligando se liga preferencialmente a um recetor mesmo na presença de outros ligandos (Sainson & Harris, 2008).

A via de sinalização Notch é normalmente ativada por interação de um ligando membranar (da família de proteínas tipo 1 da superfície celular) que estruturalmente apresenta múltiplas repetições EGF em *tandem* no seu domínio extracelular (ECD) (Kopan, 2012).

Nos mamíferos existem cinco ligandos canónicos DSL (Delta, Serrate, LAG-2): *Delta-like 1* (Dll1), *Delta-like 3* (Dll3), *Delta-like 4* (Dll4), *Jagged-1* (Jag1) e *Jagged-2* (Jag2) (Ntziachristos et al., 2014; Phng & Gerhardt, 2009).

As interações produtivas entre recetores Notch e os seus ligandos ocorrem quando estes estão presentes em células vizinhas (i.e, em *trans*). Quando recetor e ligando estão presentes na mesma célula (i.e, interações em *cis*), a ativação é inibida. As interações em *cis* determinam assim se uma célula envia (o ligando é mais abundante do que o recetor Notch) ou recebe (o recetor Notch é mais abundante que o ligando) um sinal. Alternativamente, nalguns casos, ligando e recetor são segregados em diferentes subdomínios para permitir a receção e transmissão simultânea de sinais (Kopan, 2012).

Os ligandos *Delta-like* e *Jagged* são clivados por γ -secretases e por complexos de metaloproteases ADAM, adicionando mais um nível de regulação à via de sinalização (Ntziachristos et al., 2014).

Os recetores Notch mamíferos são sintetizados no retículo endoplasmático (RE) como um precursor co-linear que é clivado por uma convertase tipo furina no local 1 (S1 – *site 1*) no complexo de Golgi, antes de serem transportados para a superfície celular (Figura 4). As proteínas Notch clivadas em S1 acumulam-se na membrana plasmática como polipéptidos diméricos compostos pelos domínios atrás descritos. A sinalização Notch depende assim da ativação proteolítica do recetor desencadeada pela ligação de um ligando às repetições EGF no NECD, expondo um segundo local de clivagem (S2), processado pela metaloprotease ADAM10/Kuzbanian, originando uma forma intermediária de Notch. Ocorrem ainda mais duas clivagens nos locais 3 e 4 (S3 e S4) do NTMD por ação de duas proteases, nomeadamente pela

TACE e presenilina/ γ -secretase, que por fim resultam na libertação do NICD (Figura 4) (Collu et al., 2014; Sainson & Harris, 2008).

O NICD é um ativador transcripcional que estruturalmente apresenta: sete repetições cdc10/ankirina, um domínio RAM23 necessário para a interação com membros da família de fatores de transcrição RBPjk, um domínio de ativação transcripcional (TAD – *Transcripcional Activation Domain*), um sinal de localização celular (NLS – *Nuclear Localization Signal*) e um domínio PeST que regula o equilíbrio estabilização/degradação da proteína (Collu et al., 2014; Ntziachristos et al., 2014).

No núcleo, o NICD liga-se aos complexos com RBPjk, inicialmente inativos, e promove a sua conversão num ativador transcripcional, seguida pelo recrutamento da proteína co-ativadora *mastermind-like 1* (MAML1) (Figura 4). As repetições ankirina parecem desempenhar um importante papel no recrutamento da MAML1 (Ntziachristos et al., 2014).

Os fatores de transcrição RBPjk são também conhecidos por RBPj ou família CSL, designação derivada dos homólogos humanos de *Drosophila* e de *C. elegans* CBF-1, *Suppressor of Hairless* (Su(H)), e LAG1, respetivamente (Collu et al., 2014).

RBPj (CSL) é um adaptador de ligação ao ADN que interage com muitas proteínas, incluindo as deacetilases das histonas (HDASCs – *Histone Deacetylases*), que preservam a conformação fechada da cromatina, e com complexos de ativação que contêm o NICD juntamente com outras proteínas como as acetiltransferases das histonas (HATs - *histone acetyltransferases*) que abrem a cromatina (Kopan, 2012).

É importante notar que, na ausência de ativação do recetor Notch, RBPj funciona como um repressor transcripcional através da ligação a co-repressores como *Hairless* em *Drosophila*, e MINT, KyoT2, HDAC e SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid recetors*) nos vertebrados (Collu et al., 2014).

A lista de genes alvo regulados por Notch depende muito do tipo celular e pode incluir genes cujos produtos estão envolvidos em aspetos fundamentais da biologia celular como a regulação do ciclo celular, diferenciação celular e metabolismo (Ntziachristos et al., 2014).

Os genes alvo do complexo Notch/RBPj melhor caracterizados pertencem à família de fatores de transcrição *basic helix-loop-helix* (bHLH) *Hairy/Enhancer of Split* (Hes), proteínas relacionadas com Hes (Hey/HRT/HERP) e *Notch-regulated ankyrin repeat protein* (Nrarp) (Collu et al., 2014; Phng & Gerhardt, 2009). As proteínas codificadas por *Hes* e *Hey*, que são repressores transcripcionais, inibem quer a sua própria expressão, quer genes a jusante que induzem as células a adotar um destino diferenciado (Figura 4) (Phng & Gerhardt, 2009; Sainson & Harris, 2008). Genes que regulam o ciclo celular ou apoptose são também diretamente expressos em resposta à sinalização Notch (Collu et al., 2014).

A ligação de Notch no ADN parece ser um processo rápido e dinâmico controlado pela cinase CDK8 e pela ligase da ubiquitina Fbxw7, seguida de fosforilação, ubiquitinação e degradação proteossômica de Notch, terminando assim a sinalização (Ntziachristos et al., 2014).

Na maior parte das situações fisiológicas os recetores Notch não ligados, presentes na superfície da membrana celular, estão constantemente a ser endocitados para depois serem reciclados de volta à membrana ou degradados no lisossoma. Diversas proteínas, incluindo ubiquitina ligases E3 (por exemplo, Deltex e Nedd4), Numb e *α-adaptin*, regulam os níveis basais de recetor Notch na superfície celular. O tráfego de Notch através do sistema endocítico é regulado pelo equilíbrio entre a ubiquitina ligase E3 Deltex e o supressor de Deltex. Este supressor favorece o transporte de Notch para o lisossoma e consequentemente a sua degradação. Por outro lado, Deltex promove a retenção de Notch na membrana limitante do corpo multivesicular, o que pode resultar na libertação do NICD por clivagem mediada pela γ -secretase e sinalização independente da presença de ligandos quando o domínio extracelular de Notch foi degradado no interior do corpo multivesicular (Collu et al., 2014; Kopan, 2012).

Nas células emissoras de sinal, a ubiquitinação do domínio intracelular do ligando, promovida pelas ubiquitina ligases E3 *Mindbomb* (Mib) e *Neuralized* (Neu), resulta na endocitose mediada por epsina que está associada à ativação do ligando. Este mecanismo regula assim interações ligando-recetor produtivas (Figura 4) (Collu et al., 2014; Kopan, 2012).

É possível que outros parceiros de ligação ao NICD regulem a via canónica (dependente de RBPj), explicando assim porque é que a sinalização Notch pode ter efeitos opostos na proliferação e sobrevivência dependendo do tipo celular (Sainson & Harris, 2008).

A via de sinalização Notch desempenha um papel fundamental na coordenação de múltiplos aspetos do comportamento endotelial durante a padronização vascular e, consequentemente, na regulação da formação e remodelação da rede vascular (Phng & Gerhardt, 2009).

No sistema vascular, a sinalização Notch participa na comunicação homotípica e heterotípica entre células endoteliais, perícitos e células do estroma (Sainson & Harris, 2008).

Entre os recetores Notch, Notch1 e Notch4 são expressos pelas células endoteliais e desempenham um papel importante no endotélio em desenvolvimento; Notch3 é crítico para a diferenciação de células de músculo liso de suporte. Os ligandos de Notch estão também presentes nas células endoteliais e nas células de músculo liso. As células endoteliais expressam, Dll1, Dll4, Jag-1 e Jag-2. Outros componentes chave da sinalização Notch expressos pelas células endoteliais incluem RBPj, Hey1, Hey2, Maml1, Numb e Nrarp (Phng & Gerhardt, 2009; G. Thurston & Kitajewski, 2008).

É de salientar que a expressão do recetor Notch4 e do ligando Dll4 é praticamente exclusiva do sistema vascular (Sainson & Harris, 2008).

No início do desenvolvimento vascular embrionário, o primeiro ligando desta via a ser expresso de forma robusta é o Dll4, seguido pelo Jag-1. O momento e a localização da expressão do Dll4 são muito semelhantes às do recetor Notch1. A maior parte das camas capilares do embrião a meio da gestação apresenta transcritos de *Dll4* e, na retina pós-natal, a expressão de Dll4 marca a terminação dos brotes capilares (as células-ponta) (Hofmann & Iruela-Arispe, 2007)

Durante o desenvolvimento embrionário murino, em determinados fundos genéticos, a haploinsuficiência de Dll4 é letal devido ao desenvolvimento de graves defeitos vasculares em fase precoces do desenvolvimento (Duarte et al., 2004).

Em fases mais avançadas do desenvolvimento, Dll4 é segregado para os componentes arteriais da árvore vascular, sendo assim considerado um marcador do fenótipo arterial. A heterozigotia para Dll4 leva à redução da expressão de ephrin-B2 e aumento da expressão de EphB4, consistente com a falha na diferenciação arterial responsável pelo fenótipo observado (Duarte et al., 2004).

Diversos estudos em peixe-zebra foram fundamentais no estabelecimento do papel crítico que a sinalização Notch desempenha na especificação arterial (N. D. Lawson et al., 2001; Nathan D. Lawson, Vogel, & Weinstein, 2002; Zhong, Childs, Leu, & Fishman, 2001). Apesar de estudos iniciais favorecerem a hipótese de que o destino venoso seria adquirido por defeito, é agora claro que a identidade venosa requer a repressão da sinalização Notch (Swift & Weinstein, 2009).

A ativação hipóxica do HIF1 α eleva a expressão do ligando Dll4; isto resulta na indução dos genes-alvo *Hey1* e *Hey2*, e na repressão do recetor nuclear específico das veias COUP-TFII nas EPCs, promovendo assim o destino arterial e a formação de artérias, para reestabelecer o aporte de sangue com maior saturação de O₂ (Fraisl, Mazzone, Schmidt, & Carmeliet, 2009).

O HIF1 α interage com Notch e é recrutado por promotores responsivos a Notch aquando a ativação desta via em condições hipóxicas (M. V. Gustafsson et al., 2005). Além disso, o fator de inibição de HIFs (FIH) pode também inibir a atividade de Notch (Kaelin & Ratcliffe, 2008). Nas artérias, Dll4 é expresso no endotélio, contudo, níveis inferiores podem também ser detetados em células de músculo liso. Dll4 normalmente é re-expresso em processos de neo-angiogénese (Hofmann & Iruela-Arispe, 2007).

Através da sobreexpressão do PDGF-R β em células murais Notch⁺, Dll4 nas células endoteliais estimula também a maturação vascular (Carmeliet & Jain, 2011a).

Alguns estudos apontam também para um papel da sinalização Dll4/Notch nos perícitos; por exemplo, a expressão de marcadores específicos de perícitos, aumenta em culturas de células

da medula óssea, com a estimulação da sinalização Notch (K. S. Stewart, Zhou, Zweidler-mckay, & Kleinerman, 2011), e um estudo recente sugere que o efeito estabilizador da sinalização Ang-1/Tie2 entre perícitos e células endoteliais é mediado pela indução da expressão de Dll4 nas células endoteliais (J. Zhang et al., 2011). Contudo, a relevância global destas observações da estabilidade mediada pela sinalização em perícitos ainda não foi esclarecida *in vivo*, uma vez que estudos anteriores não assinalam defeitos no recrutamento destas células de suporte em murganhos *dll4*^{-/-} (Geudens & Gerhardt, 2011).

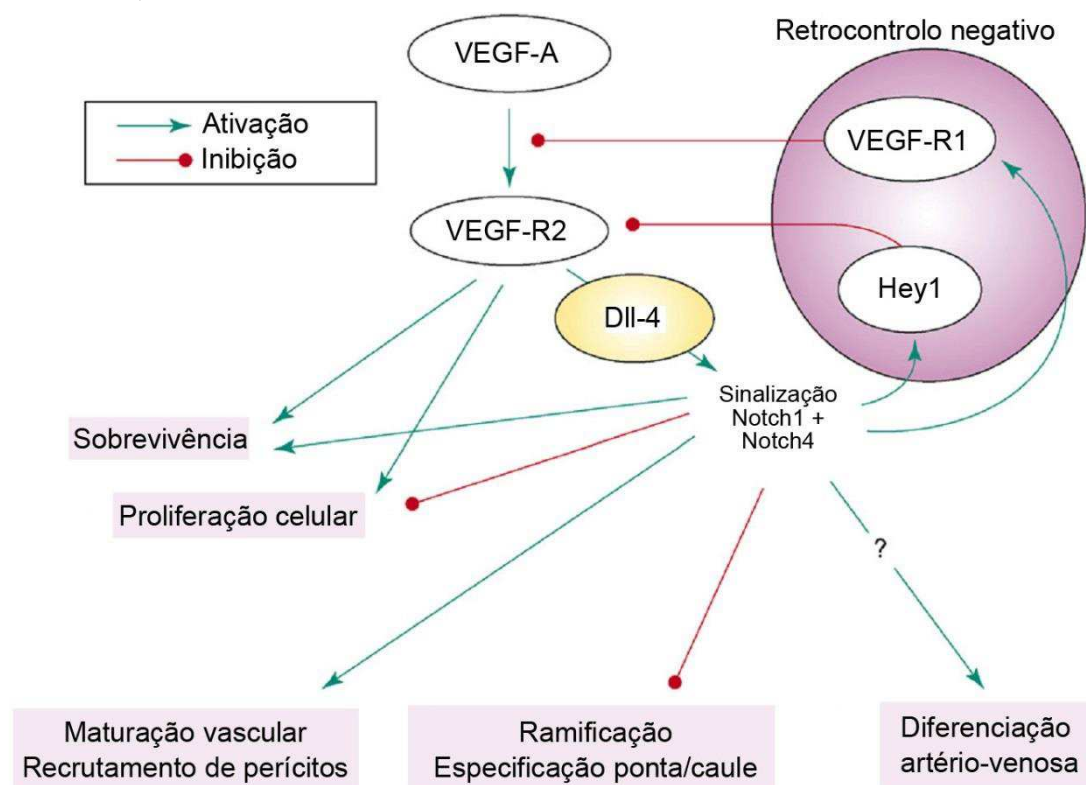
O diálogo entre as vias de sinalização Notch e VEGF é muito importante para dirigir/orquestrar o comportamento das células endoteliais durante a angiogénese (Figura 5) (Chappell, Mouillesseaux, & Bautch, 2013). Mais concretamente, os recetores Notch e o seu ligando Dll4, participam na coordenação do comportamento ponta/caule através de um mecanismo de especificação de destino celular, resultante do clássico processo de inibição lateral mediado por Notch (Geudens & Gerhardt, 2011), e por mecanismos de *feedback* positivo e negativo durante o brotamento angiogénico (Figura 5) (Benedito & Hellström, 2013; Jakobsson et al., 2010).

O VEGF-A proporciona um estímulo pró-angiogénico e induz as células que expressam o VEGF-R2 a emitir brotes e formar novos vasos, enquanto a ativação simultânea da sinalização Dll4/Notch mantém o equilíbrio necessário entre a especificação célula-ponta ou célula-caule. A discriminação ponta *versus* caule parece depender da quantidade de expressão de Dll4 induzida por VEGF-A. Células com elevada expressão de Dll4 reprimem o fenótipo célula-ponta nas células vizinhas que ficam assim comprometidas a ser células-caule (Heinke, Patterson, & Moser, 2012; Hellström, Phng, Hofmann, et al., 2007; Lobov et al., 2007; Sainson et al., 2005).

Dll4 é expresso proeminentemente nas células-ponta ricas em *filopodia* e Notch1 encontra-se nas células-caule (Heinke et al., 2012). A ativação de Notch1 em células-caule adjacentes, resulta na subregulação de *flk1* (*VEGF-R2*). O seu efector a jusante, o repressor transcripcional Hey1 (HESR1), liga-se ao promotor de *flk1*, resultando na redução dos níveis de VEGF-R2 na superfície da membrana plasmática (Figura 5). Consequentemente, as células-caule têm menor capacidade para responder à estimulação por VEGF-A e emitir protrusões filopódicas. A deteção de VEGF-A pelas células-caule desencadeia a sua proliferação em vez de migração/brotamento como nas células-ponta. Deste modo, um número suficiente de células-caule endoteliais mantém a integridade vascular e a perfusão tecidular (Benedito et al., 2009; Heinke et al., 2012; Jin, Kaluza, & Jakobsson, 2014; Marcelo, Goldie, & Hirschi, 2013; Ridgway et al., 2006; Suchting et al., 2007).

Assim, neste contexto, o Dll4 funciona como um supressor do destino célula-ponta por efetivamente conferir a identidade célula-caule nas células vizinhas (Marcelo et al., 2013; Sainson et al., 2005; Siekmann & Lawson, 2007; Suchting et al., 2007).

Figura 5 - A sinalização Dll4/Notch atua a jusante da sinalização VEGF para prevenir a angiogênese excessiva e desencadear a diferenciação terminal dos vasos recém-formados. O VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) é o principal regulador da angiogênese por brotamento, atuando através da ativação do VEGF-R2 (VEGF Receptor 2) para promover a proliferação e sobrevivência das células endoteliais. Concomitantemente, o VEGF-A sobrerregula a sinalização Notch localmente através da ativação da expressão de Dll4 (*Delta-like 4*). Por sua vez, o ligando Dll4 sinaliza através de Notch1 e Notch4 para bloquear a ramificação excessiva reprimindo a aquisição do fenótipo célula-ponta pelas células endoteliais. Por fim, Dll4 regula a maturação dos vasos inibindo a proliferação das células endoteliais, estimulando o recrutamento de células murais e também, potencialmente, a diferenciação artério-venosa. A ativação da sinalização Notch, dependente de Dll4, também atua como um mecanismo de retrocontrole negativo para bloquear a sinalização pelo VEGF através da indução da expressão do VEGF-R1 e repressão da expressão do VEGF-R2. Traduzido e adaptado de (Sainson & Harris, 2007).



O circuito de retrocontrole entre a sinalização VEGF e Dll4/Notch (Figura 5) é, em princípio, suficiente para diferenciar as células-endoteliais em células-ponta e células-caule, mas só num intervalo muito apertado de concentração do VEGF (Geudens & Gerhardt, 2011).

A perturbação da via de sinalização Notch conduz a um aumento do número de células-ponta e a brotamento e ramificação exagerados, indicando que Notch é necessário para a manutenção do fenótipo caule (Heinke et al., 2012; Hellström, Phng, & Gerhardt, 2007; Sainson et al., 2005).

Pelo contrário, a sua sobreexpressão leva à inibição da sinalização VEGF, resultando numa redução da proliferação e migração das células endoteliais e consequentemente na redução da angiogénese por brotamento vascular (Trindade et al., 2008).

A sinalização Dll4/Notch é assim essencial na repressão da angiogénese em vasos sanguíneos estabelecidos e na manutenção de um estado quiescente do endotélio (Geudens & Gerhardt, 2011). Uma vez que sinalização Dll4/Notch atua como um mecanismo de atenuação para prevenir angiogénese excessiva e promover o desenvolvimento ordeiro de novos vasos sanguíneos (Figura 5), o ligando Dll4 é considerado um fator anti-angiogénico (Lobov et al., 2007).

Nas células endoteliais, a ativação desta via de sinalização conduz à inibição da angiogénese por brotamento, tendo assim um efeito estabilizador vascular (Hellström, Phng, Hofmann, et al., 2007; Leslie et al., 2007; Lobov et al., 2007; Siekmann & Lawson, 2007; Suchting et al., 2007). Este efeito é promovido diretamente, através da indução da expressão de Nrarp (Phng & Gerhardt, 2009) e através da estimulação da produção de componentes da MEC (Benedito et al., 2008; Trindade et al., 2008; J. Zhang et al., 2011).

Além de sub-regular o VEGF-R2, a sinalização Notch também afeta o VEGF-R1 e o VEGF-R3 (Geudens & Gerhardt, 2011).

Os níveis de VEGF-R1 aumentam a jusante da sinalização Notch e existem evidências genéticas de que *flt1* atua, de uma forma dependente de Notch, como um regulador negativo da formação de células-ponta e na orientação dos brotes na vasculatura do tronco de embriões de peixe-zebra. (Funahashi et al., 2010; Jakobsson et al., 2010; Krueger et al., 2011; Phng et al., 2009; Suchting et al., 2007; K. L. Taylor, Henderson, & Hughes, 2002).

Contudo, Jakobsson e colegas (2010) sugerem que os níveis do VEGF-R2 e do VEGF-R1 atuam a montante na modulação da função Notch; os autores demonstraram que as células-ponta e as células-caule estão frequentemente a trocar de posição num mesmo brote, implicando que os fenótipos ponta e caule são estados celulares rapidamente alternantes, não fixos, existindo um *continuum* de fenótipos altamente dinâmico e intermutável de acordo com diferentes níveis de atividade VEGF-R e Notch (Benedito & Hellström, 2013; Jakobsson et al., 2010). Os destinos celulares ponta e caule parecem assim ser plásticos e não rígidos. Consequentemente, as células endoteliais que brotam baralham-se e competem continuamente pela posição ponta regulando dinamicamente os seus níveis de expressão *flkl* versus *flt1*. Além disso, foi recentemente demonstrado que a expressão da forma solúvel do VEGF-R1, nas células endoteliais adjacentes às células-ponta, atua como uma pista espacial que orienta novos brotes angiogénicos para longe do vaso de origem. Deste modo, além de controlar a sinalização por VEGF, a via

Dll4/Notch pode influenciar indiretamente a orientação local dos novos vasos (Herbert & Stainier, 2011).

Um estudo recente veio corroborar a necessidade adicional de *flt1* a montante de Notch para a modulação da sinalização VEGF, sendo por isso um componente crítico do circuito de retrocontrolo (Figura 5) que é responsável pela coordenação do comportamento endotelial durante o desenvolvimento vascular. VEGF-R1 é assim um mediador do diálogo entre VEGF e Notch ao manter a sinalização VEGF em níveis apropriados para efetivamente usar a inibição lateral de Notch. Mais, VEGF-R1 completa o circuito de retrocontrolo VEGF-Notch por reforçar ainda mais a capacidade de resposta diferencial das células endoteliais ao VEGF (Chappell et al., 2013).

A perda da modulação da sinalização VEGF por VEGF-R1 resulta numa sinalização Notch excessivamente elevada, enfraquecendo o circuito de retrocontrolo VEGF-Notch e perturbando a coordenação dos fenótipos das células endoteliais. Deste modo é previsível que as células endoteliais *flt1*^{-/-} experimentem inibição lateral excessiva via sinalização Notch. O bloqueio de Notch liberta algumas das células endoteliais da inibição lateral, permitindo que contribuam mais para a ramificação e menos para a expansão dos vasos por via da proliferação. Estas observações são consistentes com os resultados de estudos anteriores que demonstraram que as células endoteliais respondem de forma mais acentuada à inibição de Notch quando na presença de VEGF (Chappell et al., 2013).

2.1.2.2.2. Papel da via de sinalização Notch na progressão tumoral

A ativação da sinalização Notch pode contribuir para progressão tumoral através de diversos mecanismos. Além de estar envolvida na manutenção da capacidade de autorrenovação das células estaminais tumorais (CSCs – *Cancer Stem Cells*), contribui diretamente para processos celulares envolvidos na invasão tumoral (como a MET e resposta à hipóxia) (Y. Wang et al., 2011; Z. Wang et al., 2010; Z. Wang, Li, Banerjee, & Sarkar, 2009), participa no controlo da neovascularização e tem também um papel fundamental no nicho metastático (Ntziachristos et al., 2014).

Tendo em conta a sua participação em todos estes processos, a via de sinalização Notch emergiu como objeto de intensa investigação, uma vez que terapias dirigidas aos diferentes componentes da via podem permitir o desenvolvimento de novas terapias antitumorais (Gurney & Hoey, 2011).

Em diversos tipos de cancro humano, a sinalização Notch aberrante tem sido ligada à iniciação e progressão tumoral (Marco Mazzone et al., 2010; Qiao & Wong, 2009; Real & Ferrando, 2009; Sandy & Maillard, 2009). Os efeitos da sinalização Notch no comportamento tumoral

dependem essencialmente do contexto celular e da interação com várias vias de transdução de sinal, estando a alteração do estado de sinalização Notch associada a funções quer pró- quer antitumorais (A. Garcia & Kandel, 2012).

Além de serem expressos pelas células neoplásicas, os componentes da via de sinalização Notch são também expressos pelas células endoteliais tumorais (A. Garcia & Kandel, 2012).

Tal como na angiogénese do desenvolvimento embrionário, a via de sinalização Dll4/Notch desempenha também um importante papel na angiogénese tumoral (G. Thurston & Kitajewski, 2008).

As funções de Notch na angiogénese tumoral são parcialmente mediadas pelo ambiente hipóxico que se estabelece na maior parte dos tumores. Um dos principais mecanismos através do qual as células conseguem adaptar-se a uma baixa tensão de oxigénio é através da regulação do HIF1 α . Este fator interage com o domínio intracelular de Notch1 para aumentar as respostas à hipóxia a jusante de Notch (M. V. Gustafsson et al., 2005; Sainson & Harris, 2006).

Diversos estudos revelaram que os ligandos Dll4 e Jagged-1, expressos quer pelas células neoplásicas quer pelo endotélio tumoral, são particularmente importantes para diversos aspetos da angiogénese tumoral (Benedito et al., 2009; J.-L. Li & Harris, 2005; Phng & Gerhardt, 2009; Zeng et al., 2005).

A expressão de Dll4 pelas células endoteliais pode ser diretamente sobreexpressada pela hipóxia por intermédio de HIF1 α e por elementos de resposta a hipóxia no promotor de Dll4 (Diez et al., 2007), sugerindo um papel para a sinalização Dll4/Notch na adaptação dos tumores à hipóxia (A. Garcia & Kandel, 2012).

A observação de que o ligando Dll4 é robustamente expresso nas células endoteliais tumorais, quer humanas quer murinas, especialmente quando em comparação com a expressão de Dll4 em vasos do tecido normal vizinho, e de que este aumento de expressão se encontra correlacionado com a maturação e remodelação vascular que facilitam um fluxo sanguíneo eficiente, corroboram o papel da sinalização Dll4/Notch na adaptação dos tumores a condições hipóxicas (Gale et al., 2004; Hainaud et al., 2006; Mailhos et al., 2001; Noguera-Troise et al., 2006; Patel et al., 2005, 2006).

A regulação da angiogénese tumoral pela sinalização Dll4/Notch ocorre através da interação com diversas vias de sinalização, entre elas a do VEGF, mas também através da interação com outros componentes da via Notch, nomeadamente com o ligando Jagged-1 e com o recetor Notch1 (Harrington et al., 2008).

Tal como durante o desenvolvimento vascular embrionário, também na vasculatura tumoral a expressão de Dll4 parece ser regulada diretamente pelo VEGF (G. Thurston & Kitajewski, 2008). O bloqueio do VEGF em murinhos com tumores, resulta na rápida e profunda redução

da expressão de Dll4 nos vasos sanguíneos tumorais (Noguera-Troise et al., 2006). Além disso, nos tumores, os níveis de expressão de Dll4 encontram-se correlacionados com os do VEGF (Patel et al., 2006) e a estimulação de células endoteliais em cultura com VEGF aumenta a expressão de Dll4 (Patel et al., 2005). Assim, a elevada expressão de Dll4 nos vasos tumorais pode ser explicada pelos níveis elevados de sinalização por VEGF especificamente no endotélio tumoral ativado comparativamente à maioria dos vasos normais quiescentes (Gavin Thurston et al., 2007).

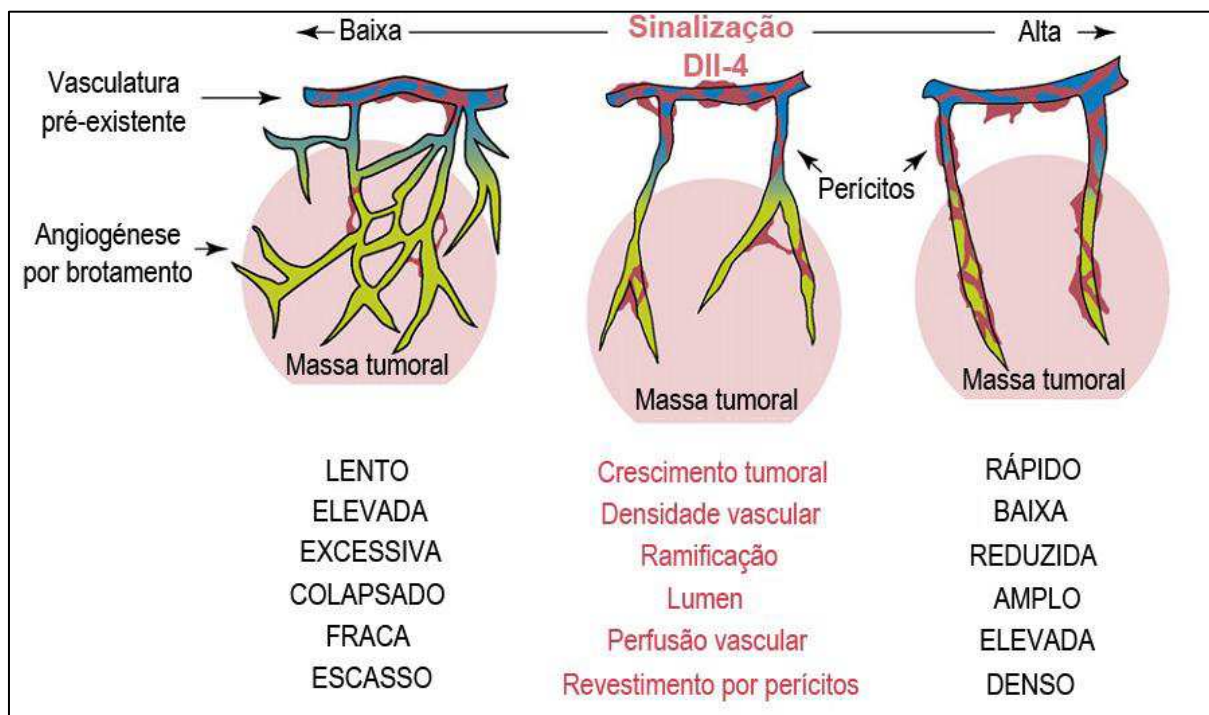
Contudo, parecem existir complexidades adicionais no microambiente tumoral (G. Thurston & Kitajewski, 2008).

De acordo com o seu papel na especificação da identidade endotelial ponta-caule durante o brotamento angiogénico, a expressão de Dll4 pelas células neoplásicas ativa a sinalização Notch nas células endoteliais do estroma hospedeiro e inibe a angiogénese tumoral (Noguera-Troise et al., 2006; Segarra et al., 2008). Tumores que expressam Dll4 apresentam uma vasculatura menos densa, o que é explicado pela inibição da proliferação celular endotelial induzida por VEGF (C. K. Williams et al., 2006) e redução da expressão do VEGF-R2 (Harrington et al., 2008). Todavia, os poucos vasos tumorais apresentam melhor estrutura e função por terem um lúmen mais amplo, resultando num aumento da perfusão e oxigenação tumoral que facilita o crescimento tumoral *in vivo*. Assim, nos tumores, Dll4 funciona como um regulador negativo da angiogénese mas atua como um fator positivo da progressão tumoral por melhorar a função vascular dentro dos tumores (Figura 6) (J. L. Li et al., 2007).

O mecanismo subjacente à promoção do crescimento tumoral por Dll4 parece estar relacionado com a marcada redução da apoptose e da hipóxia intratumoral. Apesar de se verificar uma redução do número de células neoplásicas em proliferação, isto é compensado pela redução da apoptose (Naumov et al., 2006). Assim, a ativação da sinalização Dll4/Notch nos vasos tumorais permite a saída do estado de dormência (J. L. Li et al., 2007).

Pelo contrário, a deleção de um único alelo para Dll4, além de resultar em mortalidade embrionária, reduz o crescimento tumoral devido ao desenvolvimento de uma vasculatura hiperplásica e disfuncional (Djokovic et al., 2010; Duarte et al., 2004; Gale et al., 2004). A redução da sinalização Dll4/Notch interfere com o referido mecanismo de retroalimentação negativa da sinalização VEGF e conduz ao aumento da densidade e brotamento vascular (Figura 6) (J. L. Li et al., 2007; Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Sclafani et al., 2007).

Figura 6 - A sinalização Dll4/Notch controla a densidade da rede vascular e a maturação dos vasos tumorais (verde). Níveis de sinalização Dll4/Notch superiores aos normais (Alta) podem favorecer o crescimento tumoral por induzirem uma rede vascular escassa, mas altamente funcional. Os vasos resultantes podem inclusivamente apresentar um denso revestimento por perícitos (vermelho). Pelo contrário, a inibição desta sinalização por Dll4 (Baixa) induz a formação de uma rede vascular densa de vasos fracamente perfundidos e pouco diferenciados. Adaptado e traduzido de (Sainson & Harris, 2007).



Recentemente, foi revelada uma nova forma de sinalização para os ligandos Notch, que expande o seu potencial de sinalização além do contacto célula-célula. Verificou-se que os exossomas derivados dos tumores incorporam o ligando Dll4 e conseguem transferi-lo para a membrana celular das células endoteliais do estroma, resultando na inibição da sinalização Notch e na mudança do fenótipo das células endoteliais para células-ponta (Filipazzi, Bürdek, Villa, Rivoltini, & Huber, 2012; Zhaoguo Liu, Fan, Wang, Zheng, & Lu, 2014).

Jagged-1 é um dos ligandos da via Notch envolvido na regulação de muitos dos aspetos da angiogénese tumoral. Diversos estudos têm sugerido que este ligando regula negativamente a atividade de Notch (Suchting & Eichmann, 2009) e foi já provado que existe um equilíbrio entre Dll4 e Jagged-1. Na angiogénese tumoral Dll4 funciona como um regulador negativo, encontrando-se sobreexpresso na vasculatura tumoral, enquanto Jagged-1 promove a angiogénese tumoral (Benedito et al., 2009).

No contexto da angiogénese tumoral, dois estudos sugerem que o Jagged-1, expresso pelas células neoplásicas, pode atuar de uma forma pró-angiogénica. Num deles foi demonstrado que em carcinomas de células escamosas da cabeça e do pescoço, a expressão do ligando Jagged-1, induzida por fatores de crescimento (via MAPK), nas células neoplásicas, ativa Notch em células endoteliais vizinhas e promove a formação de novos brotes capilares (Zeng et al., 2005).

No outro estudo, verificou-se que Jagged-1 expresso pelas células neoplásicas de carcinomas mamários pode também influenciar a angiogénese tumoral (Funahashi et al., 2008).

No cancro prostático metastático, é possível encontrar o aumento de expressão de Jagged-1 quando comparado com neoplasias prostáticas localizadas ou hiperplasias prostáticas benignas (Santagata et al., 2004). No cancro da mama humano, a elevada expressão de Jagged-1 e/ou Notch1 está correlacionada com baixas taxas de sobrevivência e pode estar relacionado com a interação entre Notch e os recetores de estrogénio (Reedijk et al., 2005; Rizzo et al., 2008).

Recentemente, um estudo em que foram utilizados dois tipos de modelos tumorais murinos, transplantes singénicos subcutâneos (heterotópicos) de células LLC (*Lewis Lung Carcinoma*) e um GEM transgénico que desenvolve adenocarcinoma prostático (TRAMP) (J R Gingrich, Barrios, Foster, & Greenberg, 1999; Greenberg et al., 1995), veio elucidar o papel direto da expressão de Jagged-1 a nível endotelial, na angiogénese tumoral (A. Pedrosa et al., 2015). Nesse estudo verificou-se que a perda da expressão do ligando Jagged-1, especificamente a nível endotelial, teve um forte efeito anti-angiogénico que resultou numa inibição do crescimento tumoral e na aquisição de um fenótipo invasivo. Além disso, foi demonstrado que Jagged-1 participa na regulação da proliferação e desdiferenciação das células neoplásicas prostáticas através da ativação de Notch3 e da consequente sobreexpressão de Hey1 nas células neoplásicas (A. Pedrosa et al., 2015).

Apesar de Notch4 ser expresso especificamente por células endoteliais, tal como na angiogénese fisiológica, Notch1 parece ser o mediador predominante da sinalização Dll4/Notch na vasculatura tumoral, uma vez que a utilização de anticorpos inibidores específicos de Notch1 produz efeitos nos vasos tumorais semelhantes aos obtidos com o bloqueio de Dll4 (Y. Wu et al., 2010).

Notch1 pode também ter um papel na supressão da formação de tumores vasculares. Murganhos geneticamente modificados para desenvolver a perda espontânea de Notch1, desenvolvem tumores vasculares no fígado e letalidade subsequente devido a hemorragias severas, sugerindo que o endotélio é altamente sensível à inativação de Notch (A. Garcia & Kandel, 2012; Kangsamaksin, Tattersall, & Kitajewski, 2014; Zhenyi Liu et al., 2011). Além disso, a sinalização por Notch1 parece estar constitutivamente ativa em muitos tipos de carcinomas das células renais (Sjölund et al., 2008).

Concentrações mais elevadas da proteína Notch1 em áreas tumorais adjacentes à vasculatura, sugerem que Notch pode facilitar a angiogénese no cancro da próstata (Bin Hafeez et al., 2009). Curiosamente, um outro estudo veio demonstrar que a sobreexpressão de Dll4 em células PC3 reduz a angiogénese mas melhora a perfusão vascular e a oxigenação tumoral por melhorar a estrutura e função dos vasos recém-formados, resultando no aumento da progressão tumoral em

xenotransplantes de células neoplásicas (J. L. Li et al., 2007). Deste modo parece que a função da sinalização Notch na angiogénese dos tumores prostáticos pode ser a mesma em comparação com outros tumores sólidos (G. Deng et al., 2015; Y.-Y. Hu, Zheng, Zhang, Liang, & Han, 2012).

Nas últimas décadas, a função e disfunção da via de sinalização Notch têm também sido implicadas na metastização (Y.-Y. Hu et al., 2012).

A via de sinalização Notch está envolvida na metastização, não só por regular a angiogénese tumoral mas também por regular processos de MET e *anoikis* das células neoplásicas (Y.-Y. Hu et al., 2012).

Em murganhos com perda-de-função do RBPj, a implantação de células de hepatocarcinoma leva ao desenvolvimento de tumores com angiogénese desregulada e com tendência para metastizar para o fígado. Esta observação indica que a vasculatura tumoral exuberante com elevada permeabilidade que se observa nos murganhos com perda-de-função Notch, pode facilitar a metastização hepática da linha celular neoplásica implantada (X.-B. Hu et al., 2009). Contudo, esta é uma questão que merece ser mais investigada uma vez que esta via de sinalização está também envolvida em comportamentos celulares individuais (A. Garcia & Kandel, 2012) que promovem a entrada na circulação sanguínea e o estabelecimento de metástases distais, pelo que, a sua inibição poderia, pelo contrário, resultar numa redução da metastização.

Tanto os recetores Notch como os seus ligandos são proteínas transmembranares e a sinalização apenas é ativada quando existe uma interação entre células adjacentes, o que é muito importante no processo metastático que depende de interações intercelulares e adesão (Y.-Y. Hu et al., 2012).

Uma vez que a hipóxia parece ser um dos principais motores para desencadear metastização, a interação entre a sinalização Notch e a regulação hipóxica da expressão de genes, levanta a possibilidade de as proteínas desta via terem um papel neste fenómeno. Além disso, evidências recentes sugerem que Notch pode desempenhar um papel importante no estabelecimento de populações de células estaminais que permitem a criação de nichos pré-metastáticos (A. Garcia & Kandel, 2012).

A hipóxia é um dos sinais que promove a ativação da MET. A sinalização Notch tem também sido implicada na MET por modular a subregulação de E-caderina induzida por TGF- β (Timmerman et al., 2004; Zavadil, Cermak, Soto-Nieves, & Böttinger, 2004). A ativação de Notch por Jagged-1 conduz à sobreexpressão de Snail e Slug, repressores transcricionais críticos para a MET e metastização por reprimirem a expressão de E-caderina (Y.-Y. Hu et al., 2012) em vários modelos tumorais (T. T. Chen et al., 2010; Leong et al., 2007).

Foi já demonstrado que a expressão de Hes1 está associada com o potencial metastático do osteossarcoma. *In vitro*, a inibição desta via com uma molécula inibidora da gama-secretase demonstrou conduzir à eliminação do comportamento invasivo sem afetar a proliferação e sobrevivência celular ou o crescimento independente da adesão, observações que foram confirmadas posteriormente *in vivo* (P. Zhang, Yang, Zweidler-McKay, & Hughes, 2008). Além do osteossarcoma, também no carcinoma colorrectal a maior expressão de Hes1 está associada à promoção da metastização (Veenendaal et al., 2008).

A invasividade e metastização do cancro da mama está associada à expressão do ligando Jagged-1 (Leong et al., 2007). Além disso, a inibição da sinalização Notch ativada por Jagged-1, resulta numa diminuição na metastização óssea por inibir a via Notch nas células ósseas do estroma (Sethi, Dai, Winter, & Kang, 2011). Estas observações sugerem a existência de um mecanismo através do qual a sinalização Notch funciona providenciando um microambiente hospedeiro que é favorável ao estabelecimento das células tumorais disseminadas (CTDs) (A. Garcia & Kandel, 2012).

Em linhas celulares de tumores da próstata, Jagged-1 é uma das proteínas reguladas por androgénios (D. B. Martin et al., 2004). Santagata (2004) descreveu uma associação entre a expressão de Jagged-1 e a recorrência e metastização do cancro da próstata. Relativamente a tecidos prostáticos benignos ou a tumores da próstata bem circunscritos, Jagged 1 apresenta maior expressão em células neoplásicas prostáticas associadas à recidiva do cancro após prostatectomia radical (Y.-Y. Hu et al., 2012).

A via Notch também se encontra ativada no melanoma humano. O bloqueio da sinalização Notch suprime o crescimento de células de melanoma primário, enquanto a ativação de Notch permite às células de melanoma adquirir capacidade metastática. O aumento da expressão de β -catenina e de N-caderina após a ativação de Notch1, parece ser responsável pelo aumento da metastização tumoral (Balint et al., 2005; Z.-J. Liu et al., 2006). Também no cancro pancreático e gástrico, a ativação de Notch1 está envolvida na promoção do comportamento metastático (Z. Wang et al., 2006; Yeh et al., 2009).

O regulador transcripcional humano Aes (*Aminoterminal Enhancer of Split*), um supressor endógeno da metastização, inibe a sinalização Notch por sequestrar e inativar os efetores da via no núcleo. A deleção de Aes num modelo murino de cancro do cólon conduz à ativação de Notch e consequentemente a uma marcada invasão tumoral e intravasação que é suprimida pela inibição da sinalização Notch. Dados obtidos *in vitro* indicam que a perda de Aes, aumenta a capacidade das células neoplásicas para migrar através do endotélio, uma etapa chave para a metastização (Sonoshita et al., 2011). Estes resultados implicam um papel fundamental da sinalização Notch na metastização hematogena (A. Garcia & Kandel, 2012).

2.1.2.2.3. Inibidores da via Notch

Uma vez que a clivagem proteolítica dos recetores Notch pelo complexo presenilina/ γ -secretase é um pré-requisito para a ativação da sinalização (isto na ausência de mutações a jusante que levem à ativação permanente), pequenas moléculas inibidoras da γ -secretase (GSIs) conseguem bloquear eficientemente a sinalização Notch em células T-ALL (Leucemia Linfoblástica Aguda das células T). A utilização de GSIs para inibir a sinalização Notch foi assim proposta como uma terapia molecular dirigida para o tratamento desta doença (Aster & Blacklow, 2012; Palomero & Ferrando, 2009). Contudo, vários estudos em modelos animais revelaram que a inibição sistémica de Notch resulta em toxicidade gastrointestinal devido à acumulação de células caliciformes (*goblet cells*) secretoras no intestino, resultante de alterações na diferenciação das células estaminais intestinais após a inativação de Notch. Ensaios clínicos da fase I vieram posteriormente confirmar estes efeitos colaterais do tratamento com GSIs. Assim, a inibição da via Notch utilizando apenas GSIs pode não ser a escolha terapêutica mais viável no futuro (Ntziachristos et al., 2014).

De acordo com o que foi já descrito acima, o ligando Dll4 emergiu como um alvo muito importante (Gurney & Hoey, 2011).

Em modelos animais com xenotransplantes de linhas celulares neoplásicas, a inibição de Dll4 apresenta um amplo espectro de atividade antitumoral (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Scehnet et al., 2007).

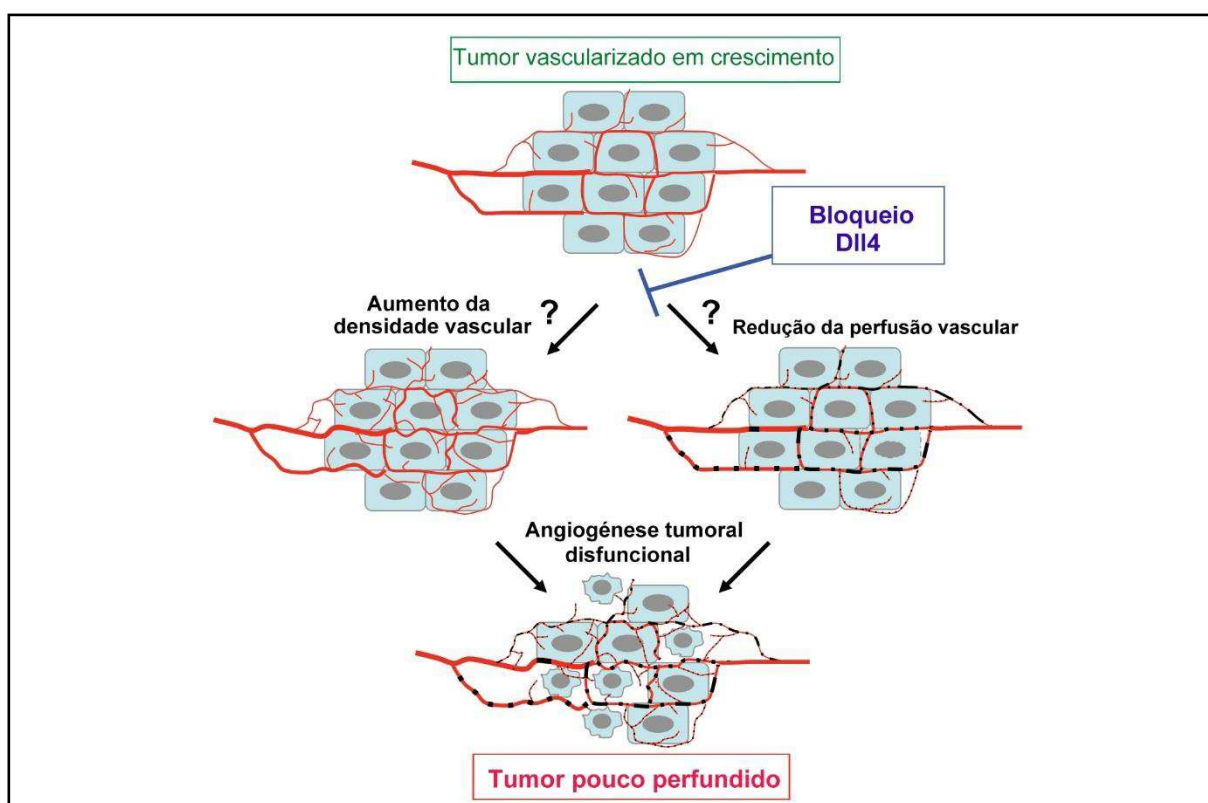
O bloqueio da ativação de Notch por Dll4 nas células endoteliais resulta na redução do crescimento tumoral através de um mecanismo anti-angiogénico distinto do dos AAs dirigidos ao VEGF, uma vez que resulta na hiperproliferação dos vasos tumorais e na redução da população de células iniciadoras tumorais (Gavin Thurston et al., 2007). Este aparente paradoxo (um efeito antitumoral por inibição de um ligando anti-angiogénico) pode ser explicado pela menor funcionalidade destes vasos tumorais. A inibição de Dll4 conduz a uma maior sobre-regulação da sinalização VEGF resultando numa hiperproliferação desregulada das células-ponta, o que, em última análise, conduz à formação de vasos imaturos sem um lúmen funcional (Figura 7) (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006).

Uma questão interessante, que ainda não foi esclarecida, diz respeito ao destino da vasculatura anormal após a interrupção deste tipo de terapia anti-angiogénica e se há alguma possibilidade de ser convertida numa vasculatura tumoral funcional (Hoey et al., 2009). Além disso, o conceito de aumentar o número de células endoteliais (células-ponta) dentro do tumor, é inquietante. Apesar da presença de um anticorpo anti-Dll4 poder bloquear a capacidade do ligando Dll4 para organizar túbulos vasculares patentes, é possível que uma curta interrupção

da terapia possa permitir a formação de uma rede vascular que não seja mais inibida por estes anticorpos (Ziyad & Iruela-Arispe, 2011).

Outra importante questão clínica está relacionada com os tipos de cancro que mais poderão beneficiar da terapia anti-Dll4. Um ponto de partida útil é considerar que níveis elevados de Dll4/Notch deverão estar correlacionados com sensibilidade à inibição da via (G. Thurston & Kitajewski, 2008). Deste modo, uma análise aprofundada dos níveis de expressão dos vários componentes da via em amostras clínicas poderá revelar-se útil (Kuhnert et al., 2011).

Figura 7 - Efeito do bloqueio da sinalização Dll4/Notch na angiogénese tumoral. O bloqueio da sinalização Dll4/Notch conduz ao estabelecimento de uma vascularização tumoral ainda mais anormal, caracterizada por maior densidade vascular, decorrente do brotamento angiogénico excessivo, e diminuição da perfusão vascular. Não se sabe ainda (?) se é a hipervascularização que conduz à má perfusão (eixo da esquerda) ou se é a má perfusão que leva à hiperproliferação endotelial (eixo da direita), ou se ambas ocorrem em paralelo. O efeito global do bloqueio de Dll4/Notch é a redução da perfusão tumoral e a consequente redução do crescimento tumoral. Traduzido e adaptado de (Kuhnert et al., 2011).



Como vimos, as vias de sinalização VEGF e Dll4/Notch apresentam uma importante interação durante a angiogénese tumoral, tendo já sido demonstrado em modelos pré-clínicos que o bloqueio simultâneo de ambas inibe marcadamente o crescimento tumoral (J.-L. Li & Harris, 2009), exibindo ainda efeitos antitumorais aditivos, comparativamente à inibição de cada uma em separado (Ridgway et al., 2006). Além disso, também em modelos pré-clínicos, o bloqueio de Dll4 consegue ter um potente efeito inibidor não só do crescimento de tumores resistentes (Djokovic et al., 2010; Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006), como também dos

que são sensíveis à terapia anti-VEGF, salientando o potencial desta abordagem terapêutica (Gurney & Hoey, 2011).

Estas observações salientam claramente as vantagens de se combinar terapias anti-angiogénicas contra estas duas vias de sinalização (Kuhnert et al., 2011).

Nos modelos tumorais pré-clínicos, a inibição farmacológica da sinalização Dll4/Notch tem sido realizada por diversos mecanismos: anticorpos anti-Dll4, vacinas de ADN, proteínas de fusão solúveis (como Dll4-Fc e *decoys* Notch-Fc), anticorpos anti-Notch e inibidores da γ -secretase (Funahashi et al., 2008; Haller et al., 2010; Hoey et al., 2009; Kalén et al., 2011; J. L. Li et al., 2007; Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Scehnet et al., 2007).

A utilização de anticorpos que interferem com a sinalização Dll4/Notch não só perturba a angiogénese tumoral como também o próprio tumor, resultando numa eficácia terapêutica mais específica e com um perfil toxicológico menor do que o que resulta da utilização de GSIs (Zhaoguo Liu et al., 2014). De fato, ao contrário dos GSIs que bloqueiam a sinalização Notch de uma forma inespecífica, a inibição específica do ligando Dll4 não causa toxicidade gastrointestinal evidente, sendo mais uma das muitas razões fazem de Dll4 um alvo muito atrativo para as terapias anti-angiogénicas usadas no tratamento do cancro (Aster, Blacklow, & Pear, 2011; Zhaoguo Liu et al., 2014; Milano et al., 2004; Ridgway et al., 2006).

Dois anticorpos dirigidos ao ligando Dll4 foram já submetidos a ensaios clínicos de fase I: OMP-21M18 (Demiczumab[®], da empresa OncoMed), (ClinicalTrials.gov, 2012) e o REGN421 (Enoticumab[®], da empresa Regeneron), para o tratamento de tumores sólidos malignos em fase avançada (Chiorean et al., 2015; ClinicalTrials.gov, 2014).

Em modelos de xenotransplantes de carcinoma de células renais (ccRCC – *clear cell Renal Cell Carcinoma*) derivados de pacientes, foi observada uma considerável atividade antitumoral de um anticorpo anti-Dll4 (REGN1035) dirigido ao Dll4 presente no estroma tumoral (K. M. Miles et al., 2014).

Além do seu papel na regulação das células endoteliais e da vasculatura tumoral, a via de sinalização Notch é conhecida por desempenhar um papel fundamental no crescimento e diferenciação das células estaminais de diversas linhagens e tipos tumorais (Indraccolo et al., 2009; Mullendore et al., 2009; A. Wilson & Radtke, 2006). No cancro colorrectal, renal, mamário e pulmonar, é possível detetar a expressão do ligando Dll4 nas células neoplásicas de uma grande proporção de amostras dos pacientes (Martinez et al., 2009).

O bloqueio de Dll4 simultaneamente nas células neoplásicas e vasculares apresenta um efeito aditivo. A inibição de Dll4/Notch não só reduz o crescimento tumoral, por resultar em angiogénese não-produtiva, como também reduz a proporção de células iniciadoras tumorais (CSCs) tal como foi demonstrado em ensaios de transplantação em série (Hoey et al., 2009).

Além disso, verificou-se que o tratamento anti-Dll4 apresenta uma atividade sinérgica com vários agentes quimioterapêuticos na redução do volume tumoral e na frequência de células iniciadoras tumorais. Em células neoplásicas humanas, a inibição seletiva da sinalização por Dll4, com o anticorpo anti-Dll4 humano OMP-21M18, resulta numa redução do crescimento de tumores do cólon, numa recorrência tumoral mais tardia após o tratamento com citostáticos, e numa redução da percentagem de células tumorigênicas (Gurney & Hoey, 2011; Hoey et al., 2009).

Foi já demonstrado que, a abordagem anti-Dll4 funciona em xenotransplantes de um conjunto de tumores do cólon, incluindo os que apresentam mutações KRAS e que são insensíveis ao tratamento anti-EGFR (M. Fischer et al., 2011). Uma vez que se pensa que as CSCs estejam envolvidas na disseminação metastática e na recorrência tumoral após os tratamentos, agentes que bloqueiem a autorrenovação das CSCs representam por isso uma grande esperança na melhoria dos tratamentos antitumorais (Gurney & Hoey, 2011).

Assim, a abordagem anti-Dll4 ataca o cancro através de dois mecanismos distintos: um efeito anti-angiogénico e um efeito antitumoral direto através da redução das CSCs, cada um deles fundamental para o crescimento tumoral maligno. Este alvo oferece por isso um tremendo potencial para melhorar a eficácia do tratamento oncológico (Gurney & Hoey, 2011).

Recentemente a atividade do anticorpo inibidor da sinalização Dll4/Notch, REGN421 (um anticorpo monoclonal IgG1 completamente humano que se liga ao Dll4 humano com afinidade sub-nanomolar e inibe a sinalização Notch) foi testado em modelos de xenotransplantes de carcinoma ovárico (Kuhnert et al., 2015). Note-se que nem todos os tipos de cancro do ovário são sensíveis a inibidores da via VEGF (Rakesh K. Jain et al., 2006) e os tumores que são sensíveis inicialmente eventualmente desenvolvem resistência aos inibidores do VEGF (Casanovas, Hicklin, Bergers, & Hanahan, 2005; R. S. Kerbel et al., 2001). Nestes modelos foi verificada uma potente atividade antitumoral do bloqueio de Dll4, dependente de inibir Dll4 especificamente no estroma. Além do efeito na angiogénese tumoral, foram identificadas interações parácrinas da sinalização Dll4/Notch espacialmente restritas que podem promover o crescimento dos tumores. Nos tumores do ovário, a atividade antitumoral do bloqueio de Dll4 foi marcadamente aumentada após o bloqueio simultâneo da sinalização pelo VEGF, enquanto as alterações vasculares secundárias nos órgãos normais, induzidas pelo bloqueio de Dll4, foram revertidas, sugerindo assim um maior benefício clínico para a combinação destas duas abordagens (Kuhnert et al., 2015).

Uma vez que as células endoteliais da vasculatura tumoral, apresentam uma marcada sobreexpressão de Dll4 na membrana, este ligando representa um potencial marcador para um DDS (*Drug Delivery System*) que permita uma terapia anti-angiogénica altamente específica e

dirigida. Recentemente, um nano-DDS, composto por nanopartículas (NP) carregadas com paclitaxel (PTX) conjugadas com o péptido GD16 (GD16-PTX-NP), que atingem especificamente o marcador angiogénico Dll4, demonstraram atividade anti-angiogénica considerável em xenotransplantes de tumores FaDu (Dll4-negativos) da cabeça e do pescoço humanos (*human head and neck cancer*) em murganhos Nude. Além disso, não se verificou toxicidade aparente nos murganhos. Estes resultados são a primeira evidência da potência e significado da nanoterapia dirigida a Dll4 na abordagem anti-angiogénica do tratamento do cancro (Y.-R. Liu et al., 2015).

Um estudo recente veio dar suporte ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas antitumorais que se baseiem no bloqueio da função de Jagged-1 a nível endotelial. O efeito angiocrino, combinado com a função pró-angiogénica e de promoção da maturação vascular de Jagged-1 endotelial pode constituir uma importante vantagem terapêutica relativamente a terapias baseadas no bloqueio do ligando Dll4 (A. Pedrosa et al., 2015).

As frações extracelulares solúveis dos recetores Notch e dos seus ligandos podem atuar como *decoys* e inibir a via de um modo dominante-negativo (Ntziachristos et al., 2014). Um *decoy* de Notch1, que bloqueia a ativação da sinalização por Dll4 e Jagged-1, demonstrou ter capacidade para restringir o crescimento vascular tumoral no modelo murino transgénico de carcinoma mamário Mm5MT (Dufraine, Funahashi, & Kitajewski, 2008). Num outro estudo, um *decoy* de Notch1 conduziu a uma redução da viabilidade das células neoplásicas em modelos de xenotransplantes (Funahashi et al., 2008). Mais recentemente, um outro *decoy* de Notch1, que bloqueia especificamente a interação dos ligandos Jagged, demonstrou conduzir a uma redução do crescimento de xenotransplantes devido a um efeito anti-angiogénico resultante da destabilização das interações entre os perícitos e as células endoteliais (Kangsamaksin et al., 2015).

Diversas companhias farmacêuticas desenvolveram também anticorpos altamente específicos para Notch1 e Notch2. Estes anticorpos inibem a formação dos NICD1/2 por estabilizarem a região reguladora negativa destes recetores, protegendo-os assim da clivagem proteolítica (Y. Wu et al., 2010). Em modelos pré-clínicos, o bloqueio seletivo de Notch1 inibe o crescimento tumoral através de pelo menos dois mecanismos: inibição da proliferação das células neoplásicas e desregulação da angiogénese (Y. Wu et al., 2010). Um anticorpo específico para Notch1, o anti-NRR1, revelou ser uma abordagem terapêutica bastante eficaz em modelos de xenotransplantes de diversos tipos de cancro humano. Um outro anticorpo específico para Notch1, que se liga ao seu domínio de ligação ao ligando, impede a ligação de ligandos endógenos e reprime assim a sinalização dependente da ativação de Notch1 em modelos murinos (Okamura et al., 2010). Estes anticorpos revelaram níveis inferiores de toxicidade

gastrointestinal e de outros efeitos adversos que resultam da inibição inespecífica conseguida com os GSIs (Ntziachristos et al., 2014).

Mais recentemente, a cloroquina, um fármaco anti-malárico que está a ser testada em pacientes com cancro, demonstrou induzir normalização vascular por promover a sinalização Notch nas células endoteliais, conduzindo a uma melhor perfusão sanguínea no tumor e a uma redução da metastização (Maes et al., 2014).

2.1.3. Desvantagens

2.1.3.1. Desenvolvimento de resistência

Uma das maiores frustrações do desenvolvimento de agentes antitumorais deriva do fato de, mais tarde ou mais cedo, os tumores que inicialmente respondiam ao tratamento se tornarem refratários a este. A responsabilidade destes relapsos pode, quase sempre, ser atribuída ao aparecimento de variantes resistentes aos fármacos, uma das consequências dos genomas altamente instáveis das células neoplásicas. Estes variantes continuam a proliferar acabando por regenerar massas tumorais com crescimento agressivo (Weinberg, 2014a).

Como vimos, muito do entusiasmo em redor das terapias anti-angiogénicas, advém da baixa probabilidade de as células atingidas, as células endoteliais, originarem variantes resistentes aos fármacos usados. A complexidade da sinalização heterotípica pode, contudo, permitir aos tumores contornar mesmo as terapias anti-angiogénicas mais inteligentes (Weinberg, 2014a)

A propensão de ambas as classes de VDAs para induzir necrose no cerne tumoral pouco perfundido, deixando uma fina camada de células viáveis na periferia está bem documentada (Baguley & Wilson, 2002; Lash et al., 1998; J. J. Liu et al., 2007; W. R. Wilson, Li, Cowan, & Siim, 1998). De um modo geral, acredita-se que este anel residual de células neoplásicas viáveis sobrevive porque estas células derivam o seu suporte nutricional da vasculatura do tecido normal adjacente, que não é afetado pelos VDAs (Siemann, Chaplin, & Horsman, 2004). O anel viável sobrevivente pode por isso atuar como uma fonte de recrescimento tumoral. Consequentemente, apenas um tratamento repetido com múltiplas doses de tais agentes poderá ter um impacto significativo no crescimento tumoral (Blakey et al., 2002; L. Li, Rojiani, & Siemann, 2002; Siemann et al., 2004; Siemann & Horsman, 2009) e os tratamentos com VDAs têm pouca probabilidade de erradicar completamente a massa tumoral (Siemann, 2011). De qualquer modo, a destruição de grandes áreas tumorais, particularmente na região central do tumor, áreas que são tipicamente mais resistentes à radiação e à quimioterapia, é claramente benéfica e desejável. Assim, é provável que os VDAs encontrem maior utilidade num contexto de administração combinada com terapias antitumorais convencionais como a radioterapia ou a quimioterapia e também com AAs (Siemann, 2011). Tendo em conta os seus diferentes

mecanismos de ação, a administração combinada de AAs com VDAs provavelmente tem efeitos antitumorais complementares (Djeha, Green, Ireson, & Kelland, 2006; Djeha, Shah, McGeever, Dobinson, & Green, 2007; W. Shi & Siemann, 2005; Siemann & Shi, 2004, 2008; Siemann et al., 2005).

Como vimos, pelo menos inicialmente, o acesso dos agentes quimioterapêuticos ao tumor é frequentemente subótimo, devido à elevada pressão intersticial no interior do tecido tumoral. Este acesso melhora durante a normalização vascular e diminui dramaticamente durante a fase avascular do tratamento anti-angiogénico. É por isso possível que, a continuação da terapia anti-angiogénica para além de um limiar temporal ou de dose, reduza a vasculatura tumoral ao ponto de deixar as células neoplásicas inacessíveis aos fármacos e mais suscetíveis à adaptação à hipóxia e desenvolvimento de resistência à anti-angiogénese (Bellou et al., 2013).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de resistência à terapia anti-angiogénica, como consequência da adaptação ao novo microambiente “anti-angiogénico”, tem atraído muita atenção como uma das razões que pode explicar o re-crescimento da massa tumoral e os resultados insatisfatórios dos ensaios clínicos. De fato, apesar de a anti-angiogénese ter surgido como uma forma de “otimizar” os vasos tumorais e melhorar o aporte de agentes citotóxicos, os agentes usados interrompem a comunicação entre as células, e mudam gradualmente o microambiente tumoral e a interação dos seus tipos celulares (neoplásicos, do estroma, inflamatórios, endoteliais, entre outros) entre si e com células de tecidos remotos como a medula óssea. A anti-angiogénese é por isso um processo inerentemente adaptável que desencadeia mecanismos compensatórios (Bellou et al., 2013).

Nos ensaios clínicos, a duração do efeito da terapia anti-VEGF é frequentemente bastante curta (Bergers & Hanahan, 2008). Em modelos pré-clínicos, uma série de tumores não responde de todo, ou apenas responde inicialmente para posteriormente se tornar resistente à inibição do VEGF (Casanovas et al., 2005; Shojaei et al., 2007). Em alguns casos experimentais, esta terapia resultou mesmo num aumento da invasividade e metastização tumoral (Ebos et al., 2009; Pàez-Ribes et al., 2009). Um problema adicional é que, apesar de esta terapia ser altamente específica, os pacientes não são selecionados com base nas vias de sensibilidade ou de resistência presentes nos seus tumores. Esta resistência tumoral à inibição do VEGF tornou-se um dos maiores obstáculos à implementação dos AAs na clínica (Cao & Langer, 2010; Cao, 2008). A compreensão dos mecanismos de resistência irá claramente permitir melhorar a eficácia da estratégia anti-VEGF quer através do desenvolvimento de novas formas terapêuticas quer através da utilização combinações lógicas com outros agentes terapêuticos (J. L. Li et al., 2011).

O fato de, frequentemente numa fase precoce, os tumores desenvolverem resistência ao tratamento anti-angiogénico indica que a eliminação das células neoplásicas por quimioterapia é mais lenta do que a adaptação, resistência e migração das células neoplásicas induzida pela hipóxia. Isto significa que existe sempre uma parte da massa tumoral que está moderadamente isquémica e sujeita à hipóxia e acidose, fatores que desencadeiam o desenvolvimento de resistência à terapia anti-angiogénica (Bellou et al., 2013).

A maioria dos mecanismos de resistência à terapia anti-angiogénica não é de natureza genética ou, pelo menos, ainda não têm uma clara explicação genética e esta tem sido sugerida como a principal razão para a resistência ser reversível e temporária (Beijnum et al., 2015). Contudo, também é possível que muitos dos vasos de tumores que crescem lentamente possam existir durante anos e que, por isso, têm muito tempo para se consolidarem como vasos robustos, bem estruturados, nos quais as células endoteliais se renovam lentamente. Este tipo de vasos tumorais pode por isso ser tão resistente aos AAs como os vasos sanguíneos normais noutros locais do corpo (Weinberg, 2014a).

Os principais mecanismos de resistência adquirida à terapia anti-angiogénica são: a redundância de sinalização por fatores de crescimento, o recrutamento de células derivadas da medula óssea, células do estroma local, cooptação vascular e mimetismo vasculogénico e aumento da invasividade e metastização. Mecanismos de resistência emergentes e para os quais ainda não existem evidências clínicas, mas que têm grande probabilidade de se revelarem participantes aparentes neste fenómeno são: a heterogeneidade das células endoteliais, o fator de crescimento endotelial vascular anti-angiogénico, vesículas extracelulares, sequestro lisossómico, resistência dependente da glicosilação e polimorfismos genéticos (Beijnum et al., 2015).

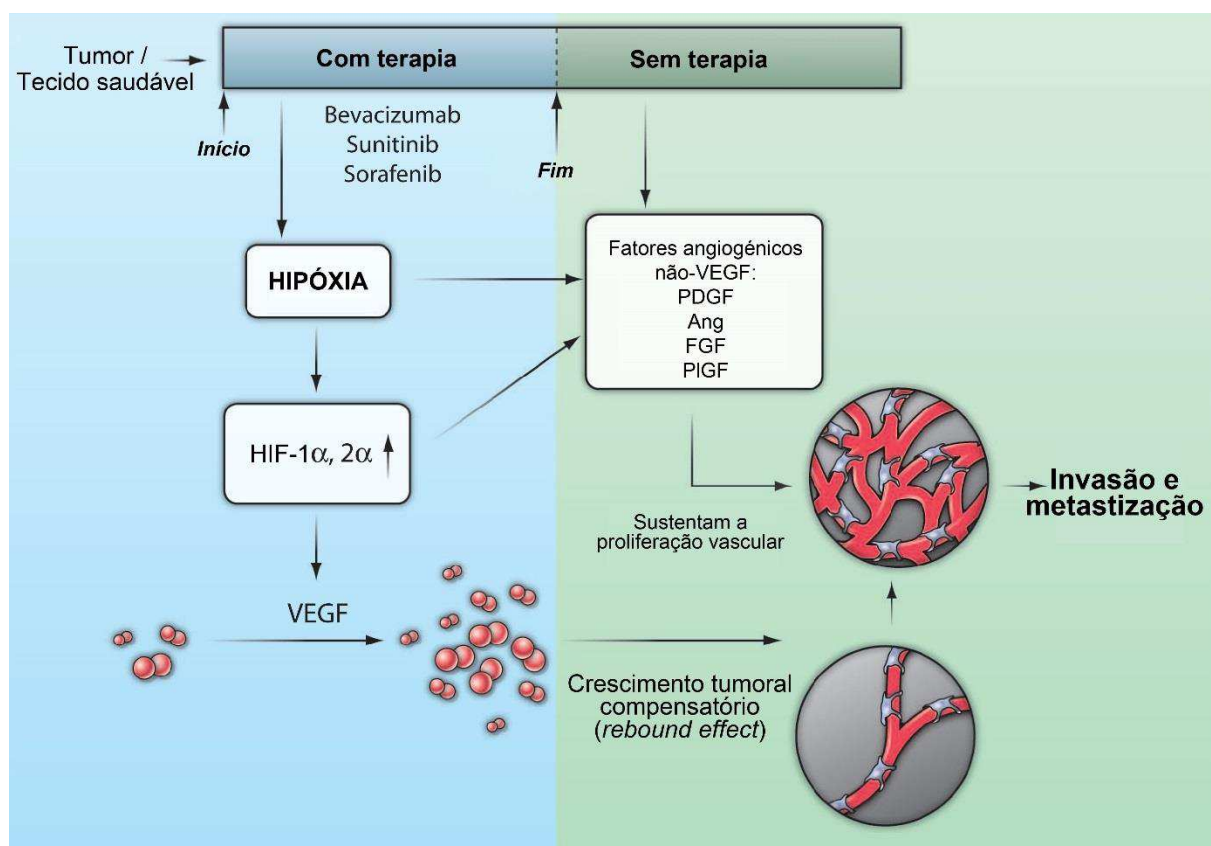
Como vimos, no microambiente tumoral, a expressão de muitos fatores de crescimento angiogénico, incluindo VEGF, pode ser induzida pela hipóxia e esta é uma das principais consequências da terapia com anti-VEGF (Casanovas et al., 2005; Ebos et al., 2009; Ebos, Lee, Christensen, Mutsaers, & Kerbel, 2007; C. Fischer et al., 2007). Nos tecidos normais, a terapia anti-angiogénica sistémica pode também levar ao desenvolvimento de hipóxia, onde é também responsável pelo aumento compensatório da expressão de diversos fatores de crescimento angiogénicos (Casanovas et al., 2005; Loges, Mazzone, Hohensinner, & Carmeliet, 2009); estas alterações induzidas pela hipóxia contribuem assim para o desenvolvimento de resistência à terapia anti-angiogénica (Figura 8) (Bergers & Hanahan, 2008; Cao, Zhong, & Sun, 2009; Casanovas et al., 2005).

Consequentemente, pode-se antecipar que dirigir a terapia apenas para um fator de crescimento angiogénico ou para seu recetor terá um efeito terapêutico limitado, quer por causa da resistência intrínseca decorrente da redundância em vias já ativadas, quer por causa da

resistência adquirida/evasiva decorrente da ativação de vias de crescimento alternativas. De fato, existem várias evidências, tanto em modelos pré-clínicos como em ensaios clínicos, de que a inibição de um fator de crescimento específico pode induzir a expressão de outros (Beijnum et al., 2015).

A interrupção da terapêutica com este tipo de agentes pode resultar num crescimento tumoral compensatório (*rebound effect*) devido à maior quantidade de fatores de crescimento pró-angiogênicos que persistem na circulação dos pacientes. De fato, um estudo revelou que a descontinuação da terapia anti-VEGF resulta na rápida revascularização dos tumores (Figura 8) (Mancuso et al., 2006).

Figura 8 - Respostas do hospedeiro induzidas pela terapia anti-angiogênica. Os agentes anti-angiogênicos induzem hipóxia quer no tumor quer nos tecidos saudáveis. A hipóxia ativa a expressão do VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e de outros fatores angiogênicos além do VEGF, incluindo o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), angiopoietinas (Ang), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento placentário (PlGF), todos eles sustentam a proliferação vascular e o consequente crescimento tumoral compensatório (*rebound effect*), a invasão e metastização. HIF – *Hypoxia Inducible Factor*. Traduzido e adaptado de (Cao & Langer, 2010).



É também cada vez mais evidente que existem mecanismos de resistência específicos do tipo de cancro e do tipo de inibidor (Beijnum et al., 2015). Assim, tal como já foi referido, estratégias anti-angiogênicas verdadeiramente eficazes dependerão da inibição simultânea de múltiplas vias de sinalização angiogênica (Weinberg, 2014a).

A interação entre as vias de sinalização VEGF e Dll4/Notch pode representar um potencial mecanismo para o desenvolvimento de resistência a terapias anti-VEGF (J. L. Li et al., 2011; Patel et al., 2006). Em modelos pré-clínicos (Gale et al., 2004; J. L. Li et al., 2007; Noguera-Troise et al., 2006; Scehnet et al., 2007), e em amostras tumorais de pacientes com cancro (Jubb et al., 2009, 2010; J. L. Li et al., 2007; Patel et al., 2005, 2006), o ligando Dll4 encontra-se predominantemente sobre-expresso na vasculatura tumoral. *In vivo*, verificou-se que a perturbação da sinalização Dll4/Notch com DBZ (dibenzazepina, um GSI) não só anula a resistência tumoral, mas também, sinergisticamente, aumenta a eficácia da terapia com bevacizumab. Assim, a sinalização Dll4/Notch parece estar envolvida no desenvolvimento de resistência à terapia anti-VEGF (J. L. Li et al., 2011). Este envolvimento ocorre essencialmente através da promoção da formação de vasos de maior calibre e também através da interação com outras vias de sinalização, nomeadamente a do FGF e a das Ephrin/Ephs (J. L. Li et al., 2011). Assim, a combinação de terapias dirigidas a VEGF e Dll4 trará claramente um efeito benéfico.

2.1.3.2. Efeitos pró-invasivos/metastáticos

O bloqueio do crescimento tumoral através da inibição efetiva da neovascularização conseguida com os AAs, leva ao estabelecimento de uma condição hipóxica no interior do tumor primário uma condição que, além de poder elicitar a resistência à terapêutica (como vimos anteriormente) (Beijnum et al., 2015) pode, paradoxalmente, promover o aumento da invasividade e metastização (Ebos et al., 2009; Pàez-Ribes et al., 2009). Esta hipóxia não só é responsável pela rápida revascularização compensatória dos tumores após a interrupção da terapia com o AA, e pelo aumento da expressão de fatores pró-angiogénicos alternativos que não são afetados pelo AA usado (Figura 8) (Cao & Langer, 2010), como desencadeia também a sobre-regulação de genes responsáveis pela sobrevivência e invasão e consequentemente a seleção clonal das células neoplásicas (Carmeliet & Jain, 2011b; A. Garcia & Kandel, 2012).

Dois estudos pré-clínicos recentes, em que foram utilizados dois modelos murinos distintos, revelaram que a inibição do VEGF, em monoterapia, resulta em efeitos antitumorais, mas também no aumento da invasividade e do potencial metastático (Ebos et al., 2009; Pàez-Ribes et al., 2009).

À primeira vista, estes resultados são inconsistentes com as observações anteriores de que a abordagem anti-angiogénica anti-VEGF reduz a metastização (Sini et al., 2008; Verheul, Hammers, et al., 2007), sendo difíceis de reconciliar com o dogma prevalente de que os tumores, primários ou metástases, necessitam de um suprimento sanguíneo para crescer (Loges et al., 2009).

Um estudo revelou que existe uma maior incidência de recorrência distante (metástases) em pacientes com glioblastoma que foram tratados com bevacizumab e quimioterapia relativamente aos que foram tratados com quimioterapia apenas, mas, de um modo geral, os pacientes tratados com a combinação sobreviveram durante mais tempo (Zuniga et al., 2009). Nos estudos pré-clínicos que documentavam que a terapia anti-VEGF inibia o crescimento do tumor primário e a metastização (Sini et al., 2008; Verheul, Hammers, et al., 2007), esta última apresentou uma correlação íntima com o volume tumoral, isto é, quanto maior era o tumor, mais células malignas podiam abandonar o tumor e consequentemente, maior era a “carga” de metástases. Verificou-se ainda que a metastização era inibida pela terapia anti-VEGF após a remoção cirúrgica do tumor primário (Mizobe et al., 2008). Contudo, existem outros estudos em que os inibidores do VEGF não inibem ou têm apenas um efeito negligenciável na metastização (Francia et al., 2008; M. Singh et al., 2012). Além disso, uma análise retrospectiva de cinco ensaios clínicos, não evidenciou uma redução do tempo para a progressão da doença, aumento da mortalidade ou alteração do padrão de progressão da doença após a interrupção da terapia com bevacizumab (D. Miles et al., 2011).

A explicação para esta divergência de resultados parece residir não só em questões inerentes ao delineamento experimental usado (variação decorrente de diferenças nas condições experimentais, o tipo de tumor e modelo de metastização, regime de administração e duração do tratamento, a classe e a dose do agente anti-VEGF (Chung et al., 2012; M. Singh et al., 2012), a utilização de monoterapia ou da combinação com citotóxicos ou outros agentes, entre outros), como também os efeitos quantitativos e qualitativos da terapia dirigida a VEGF, podem depender de uma série de variáveis. Estas incluem parâmetros relativos à vasculatura tumoral (número e funcionalidade dos vasos, a existência de angiogénese por brotamento ou por cooptação vascular, a dependência da vasculatura tumoral do VEGF, o revestimento por perícitos) e parâmetros intrínsecos ao tumor, como os níveis de VEGF, o recrutamento de células da medula-óssea, a tensão de O_2 , a metastização linfática *versus* hematogénica, entre outros (Loges et al., 2009).

Ao contrário das células normais, as células neoplásicas estão muito melhor equipadas para lidar com a hipóxia. Sob condições de baixa tensão de O_2 , são selecionados os clones de células neoplásicas que são tolerantes à hipóxia, enquanto as células neoplásicas estaminais nos nichos hipóxicos escapam ao tratamento anti-angiogénico (Brahimi-Horn, Chiche, & Pouyssegur, 2007). A hipóxia parece assim ser o motor da seleção das células neoplásicas malignas metastáticas (J. L. Yu, Rak, Coomber, Hicklin, & Kerbel, 2002). Além deste mecanismo de seleção, as células neoplásicas são também bastante competentes na fuga ao microambiente hipóxico nocivo através da ativação do programa de EMT, entre outros, que facilitam a

metastização, ou seja a fuga para microambientes mais propícios à sua sobrevivência e proliferação (Brahimi-Horn et al., 2007).

Evidências recentes indicam que o “interruptor metastático” é incitado por pequenas alterações nos níveis de oxigénio do tumor (Massimiliano Mazzone et al., 2009). Notavelmente, a expressão de diversos genes relacionados com o programa de EMT, como os reguladores principais *Twist* e *Snail*, assim como a perda do marcador epitelial E-caderina e a indução do marcador mesenquimal vimentina, têm sido verificadas após o tratamento com AAs (Cooke et al., 2012; Maione et al., 2012; Sennino et al., 2012). Assim, ao contrário das células normais, as células neoplásicas toleram melhor a hipóxia e ao mesmo tempo estão melhor equipadas para a evitarem e escaparem dela (Loges et al., 2009).

Todavia, existem dados experimentais que demonstram claramente que a invasão e a metastização durante a anti-angiogénese são eventos independentes da hipóxia e da aquisição de resistência (Bellou et al., 2013).

Num modelo de glioblastoma multiforme (GBM), a observação de um aumento da invasividade após o tratamento com bevacizumab, foi relacionada com ações inibitórias diretas do VEGF (Lu et al., 2012). O VEGF inibe o comportamento invasivo das células neoplásicas do GBM por suprimir a fosforilação do fator de crescimento dos hepatócitos (HGF – *Hepatocyte Growth Factor*) dependente do proto-oncogene *Met* (cuja proteína codificada funciona como recetor para o HGF) e a migração das células neoplásicas. Deste modo, a inibição do VEGF no GBM está inerentemente associada ao risco de promover a transição epitélio-mesenquimal e aumentar a metastização (Lu et al., 2012).

Por outro lado, no tratamento anti-VEGF, a redução da vascularização/normalização vascular está intrinsecamente associada a um maior potencial invasivo e metastático devido às diferentes consequências da sinalização VEGF/VEGF-R2 nas células endoteliais, perícitos e células neoplásicas. Em modelos murinos de metastização com células de carcinoma mamário, melanoma, carcinoma neuroendócrino e glioblastoma (Ebos et al., 2009; Pàez-Ribes et al., 2009), tendo em conta que foi verificada uma metastização acelerada após a interrupção de um tratamento de curta duração com sunitinib, a possibilidade de a anti-angiogénese estar associada a um aumento do risco de metastização em outros tumores além do glioblastoma não é negligenciável. Pelo contrário, o tratamento de tumores neuroendócrinos em murganhos RIP1-Tag2 inibindo simultaneamente a sinalização por c-Met e VEGF, não só abrandava o crescimento tumoral como também reduz a invasão e metastização (Sennino et al., 2012).

Um estudo recente, em modelos murinos de xenotransplantes de células de carcinoma renal (RCCs), revelou que o *stress* hipóxico crónico induz a sobreprodução de VEGF e resistência à hipóxia. As células neoplásicas adaptadas à hipóxia permanecem dependentes de VEGF e o

stress hipóxico não induz a resistência a terapias anti-VEGF. Pelo contrário, os agentes anti-VEGF afetam diretamente as células neoplásicas induzindo a produção de vários fatores pró-angiogênicos por estas, elicitando dessa forma a resistência devido à redundância funcional destes fatores pró-angiogênicos (Han et al., 2015).

Além das alterações tumorais intrínsecas já descritas, o tratamento anti-angiogênico pode também afetar ou condicionar o hospedeiro para ser mais permissivo para a disseminação metastática (Beijnum et al., 2015). Em murganhos tratados com sunitinib, as alterações vasculares resultantes incluem a redução da membrana basal e do revestimento por perócitos, a redução da perfusão, o aumento da permeabilidade e a redução da expressão de proteínas envolvidas nas junções de adesão (Chung et al., 2012; Maione et al., 2012; M. Singh et al., 2012; Welti et al., 2012). Como estas alterações fenotípicas ocorrem quer em vasos tumorais quer nos vasos de órgãos normais, a ação sistêmica da terapia anti-angiogênica pode facilitar a intravasação local das células neoplásicas invasoras e criar também nichos mais permissivos para a extravasação das células neoplásicas nos órgãos-alvo para colonização metastática (Beijnum et al., 2015; Welti et al., 2012).

A alteração da expressão de citocinas na vasculatura, como consequência do tratamento anti-angiogênico, pode também contribuir para facilitar o processo de metastização. Através da criação de um ambiente pro-inflamatório e conseqüentemente, da atração de diversos tipos celulares derivados da medula-óssea, pode-se formar um nicho mais receptivo às células neoplásicas extravasadas (Ebos et al., 2009; Shojaei, Simmons, Lee, Lappin, & Christensen, 2012).

Ebos *et al.* (2009), demonstrou que o pré-tratamento de murganhos saudáveis (sem tumores) com inibidores do VEGF, antes da inoculação endovenosa de células neoplásicas, também promove a metastização. Enquanto os mecanismos subjacentes ainda não estão completamente esclarecidos, os efeitos na extravasação das células neoplásicas ou na formação do nicho pré-metastático devem ser considerados. Por exemplo, os inibidores do VEGF são conhecidos por “podar” os vasos quiescentes em tecidos saudáveis, os quais, após o fim da terapia, demonstram um rápido crescimento compensatório (Figura 8); tais nichos tão bem vascularizados podem promover a implantação de células neoplásicas circulantes (Kamba et al., 2006). Além disso, mesmo em murganhos saudáveis, de uma forma dependente da dose, estes inibidores do VEGF induzem um estado de inflamação “crônica” que estimula a angiogênese de uma forma independente do VEGF (Ebos et al., 2007); algumas das citocinas inflamatórias recrutam também células endoteliais derivadas da medula-óssea e progenitores mielóides que promovem a formação do nicho pré-metastático (Kaplan et al., 2005). Talvez estas citocinas inflamem o endotélio, facilitando desse modo a adesão, a permeabilidade e a saída das células neoplásicas

da vasculatura (G. P. Gupta & Massagué, 2006). Por outro lado, como o VEGF é um fator de sobrevivência para as células endoteliais, a sua inibição pode causar a desintegração dos vasos e tornar o endotélio pró-trombótico, o que poderá também afetar a fixação das células neoplásicas em circulação (S. Lee et al., 2007).

Todas estas observações pré-clínicas vieram suscitar bastante preocupação acerca do curso mais acelerado da doença (isto é, menor tempo livre de progressão e menor sobrevivência geral) após a interrupção da terapia anti-angiogénica em contexto clínico (Figura 8) (Goldhirsch et al., 2009; D. Miles et al., 2011).

Assim, uma das questões mais prementes é se o risco de metastização associado à terapia com anti-VEGF pode superar o benefício que esta terapia tem no melhor aporte de fármacos citotóxicos através da normalização vascular resultante.

O grau de normalização vascular parece ser a chave para prevenir o aumento da invasividade e da metastização como consequência da hipóxia induzida pela terapia com AAs (Beijnum et al., 2015).

Como vimos, a normalização vascular pode providenciar novas oportunidades terapêuticas para abrandar o crescimento do tumor e aumentar a resposta dos tumores à quimioterapia e à radioterapia (Rakesh K. Jain, 2005). Outra consideração é como é que a normalização vascular deverá ser combinada com o tratamento anti-angiogénico (Carmeliet & Jain, 2011b).

Recentemente, estudos genéticos em murganhos, vieram demonstrar que a manutenção da normalização vascular pode trazer benefícios (Kuchnio et al., 2015; Massimiliano Mazzone et al., 2009). A haploinsuficiência do sensor de oxigénio PDH2 (prolil-hidroxilase 2) especificamente nas células endoteliais, induz a normalização dos vasos tumorais, sem desencadear qualquer alteração na densidade ou tamanho vascular. Nos vasos destes animais, a permeabilidade, tortuosidade e remodelação encontram-se reduzidas, enquanto a quiescência das células endoteliais, a firmeza da barreira e a maturação vascular estão aumentadas – alterações que melhoram a perfusão e reduzem a hipóxia. Forma-se também uma monocamada organizada de células endoteliais tipo-falange, que estabelecem uma barreira mais impenetrável às células neoplásicas invasoras que tentam intravasas. Todas estas alterações no sentido da normalização, não afetam o crescimento tumoral, mas reduzem a invasividade, intravasação e metastização (Massimiliano Mazzone et al., 2009). Um estudo recente veio corroborar estes dados ao revelar, num modelo tumoral espontâneo que, a haploinsuficiência ubíqua de PDH2 reduz a metastização por levar a uma redução da atividade dos fibroblastos associados ao tumor e por promover a normalização vascular (Kuchnio et al., 2015).

Como foi inicialmente proposto, a extensão da normalização vascular na lesão primária ou metastática é provavelmente dependente da dose de fármacos anti-VEGF/R relativamente ao

nível de VEGF nessas lesões. Num tumor com um certo nível de VEGF, doses muito elevadas de agentes anti-VEGF/R, podem conduzir a uma rápida redução na perfusão sanguínea, por desencadearem uma “poda” excessiva e podem não beneficiar o resultado das terapias concomitantes. Doses elevadas podem aumentar a hipóxia, resultando num aumento da metastização e no enriquecimento em células neoplásicas estaminais (Chung et al., 2012). Pelo contrário, doses mais baixas podem melhorar a perfusão e a eficácia (Rakesh K. Jain, 2014). Assim, “mais” de um inibidor de VEGF, em termos de dose e potência, não tem sido associado a um “melhor” resultado clínico, contudo este é um assunto que precisa de mais investigação (Cannistra, 2008).

Nos tumores sujeitos ao bloqueio da sinalização Notch, a vasculatura hiperplásica com graves perturbações morfológicas e deficiências funcionais, conduz à fraca perfusão e aumento da hipóxia (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Scehnet et al., 2007; Gavin Thurston et al., 2007). Estes vasos tumorais disfuncionais, com elevada permeabilidade, representam importantes estruturas para a iniciação da metastização (G. P. Gupta et al., 2007; Steeg, 2006). Nos hepatocarcinomas implantados em murganhos com perda-de-função de RBPj, a angiogénese tumoral está aumentada mas é não-produtiva e existe maior tendência para metastização hepática (X.-B. Hu et al., 2009). Estas observações indicam que a vasculatura hiperplásica com elevada permeabilidade nos murganhos RBPj *knockout*, pode facilitar a metastização dos tumores implantados, para o fígado. Assim, o bloqueio da sinalização Notch nos pacientes poderá facilitar a metastização tumoral ao mesmo tempo que diminui o crescimento tumoral primário por promover angiogénese disfuncional (Y.-Y. Hu et al., 2012). Através da utilização de modelos murinos de metastização tratados com diferentes inibidores da sinalização Notch, já usados em estudos pré-clínicos e clínicos, foi demonstrado que a inibição desta via de sinalização no microambiente hepático promove o crescimento metastático. Do mesmo modo, a perda de um alelo para Notch1 nos animais hospedeiros, conduz a um marcado aumento na metastização hepática, indicando que a sinalização Notch1 atua como um supressor metastático no microambiente hepático (Banerjee et al., 2015). A inibição da ativação da sinalização pelos ligandos Dll1/4 com *decoys* específicos para Notch1, levou ao aumento do brotamento das células endoteliais dos sinusoides para as micrometástases, suportando desse modo o crescimento metastático angiogénico precoce (Banerjee et al., 2015). Este efeito parece ser devido a uma redução da ativação de Notch nas células endoteliais dos sinusoides hepáticos (SEC – *Sinusoidal Endothelial Cells*) e nas células estreladas hepáticas (HSC – *Hepatic Stellate Cells*). A inibição da sinalização pelo ligando Jagged-1, derivado das células neoplásicas, ativa as HSC, aumentando o seu recrutamento para

a vasculatura das micrometástases, suportando dessa forma a progressão para macrometástases. Este estudo veio demonstrar que a perturbação da sinalização Notch pode induzir a ativação patológica das células do estroma hepático, conduzindo ao crescimento dos depósitos metastáticos. Estes resultados têm por isso sérias implicações para a terapia anti-angiogénica baseada na inibição da sinalização Notch (Banerjee et al., 2015).

Contudo, evidências que suportam um papel promotor da metastização para a sinalização Notch, contrariam o fenótipo pró-metastático obtido pela sua inibição.

As células neoplásicas mamárias que expressam o ligando Jagged-1 interagem com os osteoblastos, resultando num aumento da IL-6 ativa e do TGF- β , que promovem o sobrecrecimento tumoral. A inibição da sinalização Notch por Jagged-1, com GSIs, conduz a uma redução da metastização óssea dos tumores mamários, através perturbação da via de sinalização Notch nas células do estroma ósseo (Sethi et al., 2011). Estes dados revelam um mecanismo através do qual, a sinalização Notch funciona providenciando um microambiente hospedeiro que é mais permissivo à implantação das CTDs (A. Garcia & Kandel, 2012).

Existem ainda estudos que revelam um papel para a sinalização Notch na regulação de comportamentos relacionados com a EMT e metastização (J. Chen, Imanaka, & Griffin, 2010; Leong et al., 2007; Timmerman et al., 2004; Zavadil et al., 2004).

Num modelo de osteossarcoma, a inibição da sinalização Notch com GSIs, conduziu a uma redução da invasão em Matrigel, sem afetar a proliferação ou a sobrevivência (P. Zhang et al., 2008). E num modelo de rabdomiossarcoma, a inibição de Notch com GSIs, conduziu a uma redução da motilidade e da invasividade das células neoplásicas sem um efeito apreciável no ciclo celular ou apoptose (A. Garcia & Kandel, 2012; Roma, Masià, Reventós, Sánchez de Toledo, & Gallego, 2011). Como vimos anteriormente, um outro estudo, revelou que a utilização de um GSI também suprime a metastização hepática num modelo de cancro do cólon (Sonoshita et al., 2011).

Um estudo recente propôs pela primeira vez que o ligando Dll4 endotelial é responsável por iniciar a disseminação hematogénica dos carcinomas de células renais (RCC), através de interações intercelulares (Q. B. Huang et al., 2014). Os autores verificaram o aumento da densidade de expressão de Dll4 em casos clínicos de RCC com metástases hematogénicas e demonstraram, através de um modelo de regressão logística (um método de análise multivariada), que a metastização hematogénica deste tipo de cancro não só depende da angiogénese como está também associada ao tamanho do tumor e à densidade de Dll4 (Q. B. Huang et al., 2014). Além disso, a densidade de Dll4 parece ser um fator de prognóstico para a eficácia da terapêutica, uma vez que tumores com elevada densidade de Dll4 se revelaram sensíveis a AAs, enquanto tumores com baixa densidade de Dll4 se apresentaram refratários à

terapia anti-angiogénica. Funcionalmente, as capacidades de invasão e migração das RCC são diretamente aumentadas pela ligação Dll4-Notch. Com Dll4 na linha da frente das células endoteliais em migração, os autores propõem que este ligando seja responsável por mediar a degradação da MEC, facilitando a invasão por aumentar os níveis das MMP-2 e MMP-9. É de salientar que foi comprovado que a secreção destas MMPs é dependente de Notch pois a inibição do efector Hey1, resultou numa diminuição quer da MMP-2 quer da MMP-9, o que eventualmente resulta na redução do comportamento invasivo (Q. B. Huang et al., 2014). Assim, foi demonstrado que a cascata Dll4/Notch/Hey1/MMP-9 medeia uma interação direta entre as células endoteliais e as células neoplásicas, que pode eventualmente promover a metastização hematológica do RCC. Abordagens terapêuticas que perturbem esta cascata podem por isso atenuar a progressão tumoral e a metastização (Q. B. Huang et al., 2014).

Tumores inoculados em murganhos com RBPj inativado, apresentam propriedades diferentes: o hepatocarcinoma, o carcinoma pulmonar e o osteossarcoma crescem mais devagar, mas o melanoma cresce significativamente mais depressa do que quando inoculados em murganhos normais, contrariando estudos anteriores. Todos os tumores inoculados apresentaram um aumento da neovascularização e uma redução da perfusão. Além disso, apenas o hepatocarcinoma apresentou um aumento da metastização. Estas observações sugerem que o resultado das terapias antitumorais dirigidas a Notch possa, tal como no caso das terapias anti-VEGF, depender do tipo de cancro (X.-B. Hu et al., 2009).

O reconhecimento de que a sinalização Notch exerce efeitos dependentes do contexto, sugere que, para usar esta via como um alvo terapêutico, será sempre necessário caracterizar primeiro os efeitos de inibir esta via em diferentes sistemas tumorais (A. Garcia & Kandel, 2012).

É importante salientar que, apesar das evidências dos estudos pré-clínicos, até à data não existem evidências clínicas sólidas que substanciem quaisquer efeitos adversos do tratamento anti-angiogénico no controlo metastático de pacientes (Beijnum et al., 2015; Vasudev & Reynolds, 2014).

Uma questão que importa resolver é se as metástases dependem assim tanto da angiogénese como os tumores primários, uma vez que as células neoplásicas metastáticas, frequentemente apresentam maior tolerância à hipóxia (Brahimi-Horn et al., 2007).

2.1.3.3. Efeitos adversos

Atualmente, os fármacos anti-angiogénicos são administrados de forma sistémica aos pacientes, acabando por atingir inespecificamente os vasos sanguíneos de todos os tecidos e órgãos. Considerando o pequeno volume do tumor primário relativamente ao resto do organismo, a maior parte das moléculas anti-angiogénicas acaba por ser maioritariamente distribuída pelos

tecidos saudáveis após administração endovenosa (Cao & Langer, 2010). Assim, tal como a maioria das terapias antitumorais, os AAs também podem conduzir ao aparecimento de efeitos adversos, alguns dos quais podem ser fatais em 1,5 a 2,5% dos pacientes. Esta toxicidade depende não só da classe de AA (por exemplo, específicos para o VEGF *versus* TKIs), mas também do próprio agente (Rakesh K. Jain, 2014).

Os efeitos tóxicos cardiovasculares incluem a hipertensão, doença tromboembólica, disfunção do ventrículo esquerdo e isquemia do miocárdio. Os efeitos tóxicos não-cardiovasculares incluem a proteinúria, sangramento, atraso da cicatrização de feridas (Scappaticci et al., 2005), perfuração gastrointestinal, fadiga, disfunção da tireoide, estomatite, mielossupressão, efeitos cutâneos e disfonia (Siemann, 2011). Efeitos mais raros e efeitos adversos específicos de cada AA podem incluir a leucoencefalopatia posterior reversível, osteonecrose da mandíbula, hemólise microangiopática, aumento das enzimas pancreáticas e hipoglicémia. Alguns destes efeitos adversos são dependentes da dose e são frequentemente reversíveis, enquanto outros não são. Contudo, até à data, não existem ensaios clínicos de fase III que comparem o efeito de uma dose alta com o de uma dose baixa do mesmo AA na eficácia ou toxicidade (Rakesh K. Jain, 2014).

Estudos pré-clínicos em murganhos demonstraram que os inibidores do VEGF podem causar tanto a apoptose das células endoteliais como a regressão dos capilares normais em vários órgãos (Baffert et al., 2004, 2006). Os efeitos cardiovasculares que ocorrem como resultado da inibição sistémica do VEGF incluem a hipertensão, proteinúria (Hurwitz et al., 2004; Schrijvers, Flyvbjerg, & De Vriese, 2004) e perturbação da cicatrização de feridas (Scappaticci et al., 2005). Em animais, o sunitinib (um TKI), causa efeitos adversos dependentes da dose, nomeadamente, depleção da medula-óssea, toxicidade pancreática e hemorragia adrenal (Faivre, Demetri, Sargent, & Raymond, 2007).

O aumento da pressão sanguínea é um dos principais efeitos adversos relacionados com a administração sistémica quer de agentes anti-angiogénicos (Genentech Inc., 2016; Maitland et al., 2009; Siemann & Chaplin, 2007; S. Wu, Chen, Kudelka, Lu, & Zhu, 2008) quer de VDAs (Rustin et al., 2005; Siemann & Chaplin, 2007).

Em murganhos e em ratos, os VDAs que se ligam à tubulina podem induzir hipertensão (Gould et al., 2007; Ke et al., 2009) de modo semelhante ao que se verifica em humanos (Rustin et al., 2005; Siemann & Chaplin, 2007). O aumento da pressão sanguínea induzida pelos VDAs pode levar ao aparecimento de lesões cardíacas detetáveis, uma situação que pode ser prevenida inibindo a resposta hipertensiva (Gould et al., 2007). Evidências pré-clínicas sugerem que o tratamento com agentes anti-hipertensivos, pode ser uma abordagem clínica válida para prevenir os potenciais efeitos adversos cardiovasculares dos VDAs (Siemann, 2011).

Além de processar os recetores Notch, as γ -secretases clivam muitas outras proteínas de membrana e estão envolvidas num grande número de vias de sinalização além da Notch. Estas funções pleiotrópicas provavelmente contribuem para a toxicidade dos GSIs (Beel & Sanders, 2008; Hemming, Elias, Gygi, & Selkoe, 2008).

O tratamento com GSI tem sido associado a toxicidade gastrointestinal severa, limitando a sua utilidade terapêutica. Este efeito adverso surge devido à inibição combinada dos recetores Notch1 e Notch2 no compartimento de células estaminais progenitoras nas criptas intestinais (Aster et al., 2011; Imbimbo, 2008)

Como vimos, comparativamente a órgãos normais, o ligando Dll4 está fortemente sobre-expresso no endotélio tumoral, sendo esta a principal razão para usar este ligando como alvo das terapias anti-angiogénicas. Contudo, tem uma expressão menor, mas significativa, em pequenas artérias e capilares dos tecidos normais, assim como no estroma do timo e no trato gastrointestinal (Benedito & Duarte, 2005; Gale et al., 2004; Jubb et al., 2009, 2010; Patel et al., 2006).

Assim, o desenvolvimento clínico de inibidores da sinalização Dll4/Notch requer uma avaliação cuidada de possíveis efeitos adversos para estabelecer um índice terapêutico formal. Além das funções na angiogénese tumoral, a sinalização Dll4/Notch também desempenha um papel crucial no desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T. Durante o desenvolvimento, a deleção específica de Dll4 nas células epiteliais do timo, resulta no bloqueio completo do desenvolvimento dos linfócitos T e está associado a uma acelularidade tímica e ao aparecimento ectópico de linfócitos B imaturos (Hozumi et al., 2008; Koch et al., 2008). Em murganhos adultos, estudos subsequentes em que se realizou o bloqueio farmacológico de Dll4, vieram demonstrar que a sinalização Dll4/Notch continua a ser necessária para a diferenciação dos linfócitos T no timo (Billiard et al., 2011). Estes estudos demonstraram também a reversibilidade deste fenótipo após a interrupção do tratamento com anticorpos anti-Dll4, o que tem importantes implicações para o potencial uso clínico de inibidores desta via de sinalização (Kuhnert et al., 2011).

Além dos efeitos no timo e nos linfócitos T, nos roedores a inibição de Dll4 ou a perda de um dos seus alelos, tem sido associada ainda a outros efeitos adversos que incluem a hiperproliferação vascular no fígado e o desenvolvimento de neoplasias vasculares benignas (hemangiomas) (Djokovic et al., 2010; Yan et al., 2010). Estes dados suscitam uma especial preocupação sobre possíveis efeitos adversos associados à utilização clínica da terapia anti-Dll4 (Gurney & Hoey, 2011).

Um estudo recente revelou que o bloqueio crónico de Dll4 em murganhos, ratos e macacos induz proliferação vascular a nível do fígado. Esta proliferação surge associada a alterações

hepatocelulares, assim como ao desenvolvimento de lesões vasculares subcutâneas com características neoplásicas em ratos (J. Li, Jubb, & Harris, 2010; Yan et al., 2010).

A inibição específica do ligando Dll4 não causa a toxicidade gastrointestinal associada ao bloqueio inespecífico da sinalização Notch com GSIs. Contudo, o tratamento com um anticorpo específico para Dll4 durante 3 semanas desencadeia alterações histopatológicas evidentes, nomeadamente, a dilatação dos capilares sinusoides e a atrofia dos hepatócitos centrolobulares, no fígado de murganhos sem tumores (Yan et al., 2010). A utilização do mesmo anticorpo em ratos (Sprague–Dawley) e macacos (*Macaca fascicularis*) resultou numa histopatologia hepática semelhante, indicando uma função altamente conservada para Dll4 no fígado (Yan et al., 2010). Alterações semelhantes foram observadas quando em vez de um anticorpo, foi administrada uma forma solúvel recombinante de Dll4, um anticorpo inibidor específico para Notch1 ou a DBZ (Yan et al., 2010). De acordo com a sua íntima relação espacial, a ativação anormal das células endoteliais após a interrupção da inibição de Dll4 pode ter um impacto na homeostasia e função dos hepatócitos (Yan et al., 2010). Do mesmo modo, nos ratos, tratados com anti-Dll4 durante 8 semanas, desenvolve-se uma atrofia marcada dos cordões hepáticos centrolobulares, dilatação dos sinusoides hepáticos centrolobulares, proliferação dos ductos biliares e ainda alterações da funcionalidade hepática detetadas por testes sanguíneos (Yan et al., 2010). Além destas alterações, e de acordo com a função da sinalização Dll4/Notch1 no desenvolvimento dos linfócitos T (Koch et al., 2008), verifica-se ainda uma proeminente atrofia do timo em animais imunocompetentes tratados com anticorpo anti-Dll4 (Yan et al., 2010). Adicionalmente, verificou-se ainda uma significativa sobreexpressão de genes específicos do endotélio como *Egfl7*, *Esam* e *Lgals1*, assim como de genes implicados na proliferação e na regulação do ciclo celular, incluindo *Mcm3* e *Mcm7* (Yan et al., 2010).

Notavelmente, o bloqueio crónico de Dll4 em ratos macho, resultou num aumento, dependente da dose, do aparecimento de tumores subcutâneos ulcerantes que se apresentavam tipicamente bem circunscritos e com extremidades apenas focalmente infiltrantes. A maior parte das áreas destes tumores apresentava-se celularizada, mas algumas regiões revelaram áreas com necrose central. Um estudo mais detalhado revelou que estes tumores tinham características de neoplasias vasculares com componentes celulares interdigitados com vasos sanguíneos de forma e tamanho irregular (Yan et al., 2010). Os tumores mais volumosos surgiram nos animais que receberam a dose maior de anticorpo anti-Dll4, uma dose que pode estar além da necessária para bloquear esta via de sinalização nos vasos tumorais em contexto clínico (Yan et al., 2010). As características descritas pelos autores são consistentes com o diagnóstico de angiossarcoma, uma neoplasia das células endoteliais em humanos (J. Li et al., 2010). De fato, a descrição das áreas celularizadas destes tumores é remanescente de diferenciação epiteloide, uma

característica de angiossarcomas altamente agressivos. Esta distinção é importante, uma vez que os angiossarcomas, não elegíveis para excisão cirúrgica, têm um prognóstico exceccionalmente mau e aqueles que são excisados têm uma elevada taxa de reincidência (J. Li et al., 2010). Será importante determinar se alterações patológicas semelhantes serão observadas após a administração de doses clinicamente relevantes de anticorpo anti-Dll4 (J. Li et al., 2010).

Contudo, foi demonstrado que os efeitos na função hepática são revertidos após a interrupção do tratamento (Yan et al., 2010).

Em modelos murinos genéticos, a perda-de-função de Dll4 ou Notch1, também conduz à ativação das células endoteliais hepáticas e à formação de lesões vasculares no fígado (Djokovic et al., 2010; Zhenyi Liu et al., 2011), contudo, nestes modelos não se verificaram lesões cutâneas e as alterações vasculares hepáticas observadas nos murganhos com perda-de-função de Dll4 foram prevenidas por um tratamento concomitante com sEphB4-Alb (Djokovic et al., 2010). Esta observação levanta a hipótese de a indução das alterações vasculares, em alguns órgãos, poder ser manipulada pela combinação de diferentes terapias anti-angiogénicas, ao mesmo tempo que se obtêm efeitos antitumorais aditivos (Kuhnert et al., 2011)

Uma nota final importante: nos dois ensaios clínicos de fase I com anticorpos anti-Dll4 (OMP-21M18 da OncoMed e REGN421 da Regeneron), que entretanto já terminaram, não foi reportada quer toxicidade hepática quer o aparecimento de neoplasias vasculares (ClinicalTrials.gov, 2012, 2014).

O desenvolvimento da terapia oncológica anti-angiogénica tem sido marcado por avanços e recuos. Tendo presentes todos os benefícios possíveis de obter com esta abordagem terapêutica, mas também todas as questões paradoxais que têm surgido, será prioritário compreender melhor (ou mesmo descobrir outros) os mecanismos moleculares básicos envolvidos na angiogénese e estudar a melhor forma de tirar partido de uma abordagem multifatorial no combate ao cancro.

2.2. Tetraspanins

As tetraspanins (Tspans) têm sido pouco estudadas e subapreciadas, apesar da sua presença em praticamente todos os tipos celulares e tecidos (Hemler, 2005). Mesmo 20 anos após a sua descoberta, e apesar dos elevados níveis de expressão na membrana plasmática e nas vesículas intracelulares, as tetraspanins continuam entre as moléculas transmembranares mais misteriosas (Charrin et al., 2009).

As proteínas da superfície celular da família das tetraspanins são pequenas e frequentemente iludem a deteção bioquímica e imunológica por se encontrarem escondidas pela variedade de longas glicoproteínas em seu redor na membrana celular. A falta de anticorpos monoclonais de murganho para muitas das Tspans humanas, pode ser o resultado da incapacidade do sistema imunitário do murganho para reconhecer as Tspans na superfície de células humanas intactas (Hemler, 2005). Apesar da sua importância biológica e dos muitos avanços alcançados nas últimas duas décadas, a maior parte das Tspans continuam funcionalmente inexploradas devido à subtilidade e redundância das suas funções (S. Huang, Tian, Chen, Yu, & Xu, 2010). Outra das razões pela qual têm sido moléculas pouco estudadas é o facto de, com raras exceções, as Tspans não desempenharem funções típicas de ligando-recetor de superfície celular (Hemler, 2005).

Os membros mais imunogénicos deram origem a diversos anticorpos monoclonais e formaram um conjunto de diferenciação (nomenclatura CD – *Cluster of Differentiation*). Contudo, na nova nomenclatura proposta, Tetraspanin é abreviado para Tspan e cada proteína é identificada por um número específico (Yáñez-Mó, Barreiro, Gordon-Alonso, Sala-Valdés, & Sánchez-Madrid, 2009).

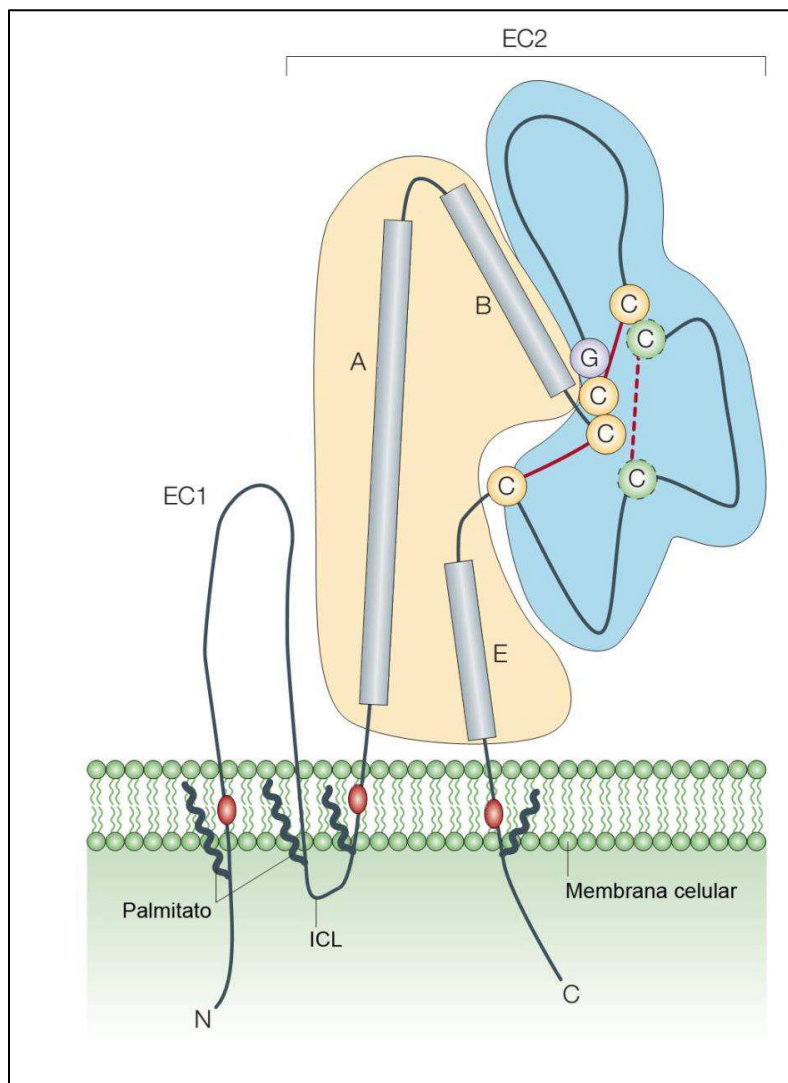
Esta grande família de proteínas transmembranares, que conta com 33 membros nos mamíferos, apresenta considerável importância funcional e começa agora a ganhar mais destaque (Hemler, 2005). Tal como para outra grande família de proteínas transmembranares, a das integrinas, os genes que codificam Tspans são virtualmente expressos em todos os tipos celulares nos animais, plantas, fungos e amebas (Hemler, 2001; S. Huang et al., 2010). A expressão das Tspans em invertebrados, indica que estas moléculas surgiram numa fase precoce da evolução. Algumas Tspans, apresentam uma ampla distribuição, enquanto outras têm um padrão de expressão muito restrito (Boucheix, 2001).

As Tspans são proteínas de superfície com 204 a 355 aminoácidos (aa) e com um peso molecular entre 25 a 50kD (Boucheix, 2001; Hemler, 2001).

Estruturalmente, as Tspans caracterizam-se por quatro domínios transmembranares, duas ansas (*loops*) extracelulares, uma pequena ansa (*loop*) intracelular (ICL) e curtas caudas terminais citoplasmáticas (Figura 9) (Bailey et al., 2011; Stipp, Kolesnikova, & Hemler, 2003).

Os quatro domínios transmembranares delimitam duas regiões extracitoplasmáticas de tamanho desigual, a ansa extracelular curta (EC1) e a ansa extracelular longa (EC2) (Figura 9) (Boucheix, 2001; Hemler, 2005).

Figura 9 - Características estruturais das tetraspanins. As Tspans são constituídas por quatro domínios transmembranares, por uma ansa extracelular (EC) mais curta (EC1), uma ansa intracelular muito curta (composta tipicamente por 4 aminoácidos) (ICL) e por uma ansa extracelular mais longa (EC2), flanqueada pelas caudas citoplasmáticas N-terminal e C-terminal relativamente curtas (compostas por 8 a 21 aa, salvo raras exceções). A EC2 é subdividida numa região constante (a amarelo, com as hélices- α A, B e E) e numa região variável (a azul), com diversos locais de interação entre proteínas. Enquanto a maior parte dos locais de interação proteína-proteína e epítomos para anticorpos monoclonais se localizam na EC2, pouco se sabe acerca da estrutura e função da EC1. Todas as Tspans contêm um motivo CCG a seguir à hélice B, e dois outros resíduos de cisteína conservados (amarelo), que estão orientados para formar duas pontes dissulfeto intramoleculares (linhas vermelhas). Muitas Tspans contêm dois resíduos adicionais de cisteína (verde), que formam outra ponte dissulfeto intramolecular (linha vermelha interrompida). Os domínios transmembranares 1, 3 e 4 contêm tipicamente aminoácidos polares (Asn, Glu, Gln; formas ovais vermelhas) com função desconhecida. Quase todas as Tspans contêm ainda cisteínas proximalmente à membrana que sofrem palmitoilação. Além dos assinalados na figura, pelo menos outros 18 aa (que se encontram na EC2, nos domínios transmembranares e na ICL) encontram-se altamente conservados (com 65-95% de identidade aminoacídica) entre todas as Tspans conhecidas. Traduzido e adaptado de (Hemler, 2005).



Apesar de diversos tipos de proteínas apresentarem quatro domínios transmembranares, não se podem incluir como membros da família Tspan a não ser que contenham resíduos conservados específicos, nomeadamente o motivo CCG (CysCys-Gly) e dois a seis outros resíduos de cisteína na EC2 que contribuem para duas pontes dissulfeto cruciais no interior da segunda ansa extracelular e importantes na manutenção da estrutura composta por cinco hélices alfa (Figura 9) (Bailey et al., 2011; Hemler, 2001, 2005).

Muita da homologia entre Tspans encontra-se confinada aos domínios transmembranares que contêm alguns aminoácidos polares conservados. A maior divergência na sequência observa-se nas ansas extracelulares (Maecker, Todd, & Levy, 1997).

Todos os locais conhecidos de interação das tetraspanins com outras proteínas localizam-se na grande ansa extracelular (EC2) (Hemler, 2005). Para muitas destas proteínas parceiras não se conhece o mecanismo pelo qual são reguladas pelas Tspans e ainda não foi esclarecido se se associam com uma ou mais Tspans específicas ou com os microdomínios de Tspans de uma forma mais geral (Bailey et al., 2011).

Apesar dos consideráveis avanços na compreensão da sua importância fisiológica e da sua implicação em diversas doenças, a função molecular de cada Tspan continua hipotética (Charrin, Jouannet, Boucheix, & Rubinstein, 2014).

Um conceito emergente é o de que a membrana plasmática é mais do que uma simples barreira física, funcionando como uma estrutura fundamental à comunicação celular com o ambiente exterior. A polaridade celular e a distribuição não-aleatória dos constituintes da membrana são cruciais para diversos processos biológicos, incluindo a adesão intercelular ou a adesão à matriz extracelular, a sinalização intracelular, secreção e endocitose (Yáñez-Mó et al., 2009).

Foi já demonstrado que as Tspans organizam-se lateralmente com outras proteínas de membrana para formar os chamados microdomínios enriquecidos por tetraspanins (TEMs – *Tetraspanin-Enriched Microdomains*) (Hemler, 2014). Desprovidas de atividade enzimática intrínseca, as Tspans atuam assim como “facilitadores moleculares”, agrupando proteínas de superfície celular específicas, aumentando dessa forma a formação e estabilidade de complexos de sinalização funcionais (Maecker et al., 1997; Vasse et al., 2015; Yáñez-Mó et al., 2009). No contexto dos TEMs, as Tspans podem influenciar diversos processos biológicos, incluindo a morfologia celular, adesão, motilidade, proliferação, diferenciação, fusão, invasão, fagocitose, exocitose, sinalização por recetores, formação de sinapses, tráfego de proteínas entre outros (S. Huang et al., 2010).

Lípidos e proteínas transmembranares selecionadas são componentes importantes dos TEMs (Boucheix, 2001; Charrin et al., 2009, 2014; Hemler, 2003; Perez-Hernandez et al., 2013; Yáñez-Mó et al., 2009).

As proteínas que se associam com Tspans podem ser classificadas (não exclusivamente) em diversos grupos principais: integrinas e outras moléculas de adesão (molécula de adesão celular epitelial (EpCAM – *Epithelial Cell Adhesion Molecule*), molécula de adesão vascular endotelial 1 (VCAM-1 – *Vascular Cell Adhesion Molecule*) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1 – *Intercellular Adhesion Molecule 1*), entre outras), proteínas com domínios tipo imunoglobulina e ectoenzimas (incluindo endopeptidases e metaloproteinases), e ainda moléculas de sinalização intracelular tais como proteínas-G heterotriméricas, PI4K (*phosphoinositide 4 kinase*) e proteína cinase C ativada (PKC) (Charrin et al., 2009).

As Tspans têm assim sido implicadas num número crescente de atividades celulares. A maior parte destas funções são no campo da adesão celular (à MEC, outras células ou a agentes patogénicos), comunicação intercelular, fusão membranar e sinalização intracelular (Yáñez-Mó et al., 2009).

Os TEMs podem promover estes processos por agrupar funcionalmente moléculas relacionadas ou por empacotar estreitamente um número crítico de recetores específicos na membrana plasmática. Os TEMs podem assim ajudar no rápido estabelecimento de ligações multivalentes ligando-recetor, resultando num fenómeno de adesão com um limiar superior, mas com um resultado mais robusto. Além disso, ligandos de recetores de adesão incluídos em TEMs são frequentemente multivalentes (tal como as repetições múltiplas nas proteínas de matriz) ou estão incluídos em TEMs das células parceiras (Yáñez-Mó et al., 2009).

A ligação de um recetor presente num TEM afeta a dinâmica de difusão dos outros componentes do nanodomínio reforçando a evidência de que os TEMs são unidades físicas (Barreiro et al., 2008). Além da regulação do tráfego intracelular, a inserção de recetores em TEMs aumenta a sua concentração local na membrana, o que é crucial para processos de adesão durante a fusão espermatozóide-oócito, desenvolvimento embrionário, ativação do sistema imunitário e extravasação de células imunitárias ou tumorais (Perez-Hernandez et al., 2013).

Contudo, enquanto moléculas individuais, as Tspans são trocadas continuamente entre nanodomínios independentes, alternando de estados confinados para estados mais difusos aleatórios distinguidos por diferente coeficientes de difusão (Yáñez-Mó et al., 2009).

As Tspans são usadas frequentemente como marcadores proteicos de vesículas extracelulares (EVs – *Extracellular Vesicles*) como exossomas ou ectossomas, participando na regulação da internalização e reciclagem dos recetores associados (Perez-Hernandez et al., 2013).

A rede de interações formada pelos ligandos dos TEMs é responsável por uma grande parte do proteoma exossomal, sugerindo que os TEMs desempenham um papel central na estabilização destas estruturas (Perez-Hernandez et al., 2013).

2.2.1. Tetraspanins na biologia vascular

Entre as 33 Tspans humanas, a expressão e função das Tspans mais recentemente identificadas no sistema vascular ainda não foi elucidada (F. Zhang, Kotha, Jennings, & Zhang, 2009). Eventos vasculares como a formação da neointima, angiogénese e trombose são rigorosamente controlados por proteínas de adesão celular, como por exemplo, integrinas, e as Tspans são moléculas chave nos processos de adesão e migração. As Tspans podem assim ser responsáveis por regular importantes fenómenos fisiopatológicos do sistema vascular (F. Zhang et al., 2009). Nas células endoteliais, compreender precisamente como é que as proteínas são reguladas dentro dos microdomínios de membrana pode fornecer novos tratamentos para diversas doenças, desde a inflamação a cancro (Bailey et al., 2011).

No tecido vascular e nas plaquetas, as Tspans regulam claramente a migração celular e interações intercelulares. No tecido vascular, uma das funções das Tspans parece ser a modulação das propriedades adesivas e migratórias das células endoteliais. Outro atributo característico das Tspans vasculares é a sua localização em vesículas celulares, sugerindo que estas moléculas regulam eventos de tráfego e libertação destas estruturas (F. Zhang et al., 2009). Entre as proteínas de membrana que são funcionalmente reguladas por Tspans, e que estão também envolvidas na angiogénese, temos diversas proteases ligadas à membrana, incluindo a ADAM10, ADAM17, MT-MMP1 e diversos precursores de factores de crescimento ancorados à membrana. Além disso, diversas Tspans, em particular, CD9, CD82 e CD151, associam-se a ou modulam a sinalização a jusante de recetores tirosina cinase. Contudo, até agora, não existem quaisquer evidências de que uma Tspan específica se associe diretamente com estes recetores. Pelo contrário, diversos estudos sugerem que os mecanismos subjacentes, pelo menos para CD82, possam ser indiretos e que o efeito da CD151 na sinalização por estes recetores possa ser uma consequência do emparelhamento físico ou funcional com integrinas de ligação a laminina (Charrin et al., 2014).

Através da utilização de anticorpos monoclonais as seguintes Tspans foram já identificadas nas células endoteliais: CD9, CD63, CD81, CD82, CD151, Tspan4 e Tspan8 (Bailey et al., 2011). Como já foi referido, não existem anticorpos contra cerca de metade das 33 Tspans humanas, pelo que, a expressão ao nível do ARNm foi estudada por análise em larga escala de dados transcriptómicos publicamente disponíveis de experiências SAGE (*serial analysis of gene expression*); através desta abordagem, foi possível identificar a expressão de 23 Tspans em HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) e de 17 Tspans em células endoteliais hepáticas (Bailey et al., 2011). A CD9, CD151, CD63 e CD81 são Tspans endoteliais relativamente bem caracterizadas e estão entre as mais expressas nas bibliotecas SAGE. Além destas, um conjunto de outras Tspans nunca antes descritas nas células endoteliais também

apresenta expressão elevada, nomeadamente, Tspan3, Tspan17, Tspan9, Tspan6, Tspan18 e Tspan14. Uma vez que permanecem inteiramente ou maioritariamente inexploradas, futuramente vale a pena aprofundar o seu estudo nas células endoteliais (Bailey et al., 2011).

Os murganhos com deleção ou inativação dos genes para algumas Tspans expressas pelas células endoteliais não demonstraram quaisquer anomalias na vascularização (Champy et al., 2011; Geisert et al., 2002; Miyado et al., 2000; Miyazaki, Müller, & Campbell, 1997; Risinger et al., 2014; J. Schröder et al., 2009; Y. Takeda et al., 2003, 2007; Wright et al., 2004), sem dúvida devido à redundância funcional das diferentes Tspans (Vasse et al., 2015). Apenas os murganhos nulos para Tspan12 apresentam defeitos de vascularização limitados à retina (Junge et al., 2009).

No entanto, diversos estudos indicam que as Tspans estão implicadas na neoangiogénese, apesar de os mecanismos fisiológicos subjacentes à sua ação ainda não terem sido completamente elucidados (Vasse et al., 2015).

Nas células endoteliais CD9, CD81, CD151 e a CD9 Partner-1 (CD9P-1) interagem entre si e também com as integrinas $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$. Os murganhos nulos para CD9 ou CD151 (ou a utilização de ARN de interferência para estas Tspans), apresentam diminuição da angiogénese, sugerindo que estas Tspans cooperam entre si para formar um microdomínio necessário à angiogénese (Vasse et al., 2015).

A CD9 (Tspan29) está entre as Tspans melhor estudadas e é expressa em diversos tipos celulares nos quais interage com muitas outras proteínas diferentes, incluindo integrinas, membros da família das imunoglobulinas, proteoglicanos, claudinas, entre outras (Yáñez-Mó et al., 2009).

A CD9 está envolvida na regulação de fenómenos como a morfologia, migração, proliferação e fusão celular, e também na metastização de células tumorais (Boucheix, Duc, Jasmin, & Rubinstein, 2001; Hemler, 2005). A CD9 foi a primeira Tspan para a qual foi produzido um murganho *knockout* (Kaji et al., 2000).

Resultados de ensaios *in vitro* em que se utilizaram células de músculo liso (SMCs) das artérias coronárias, indicam que a CD9 é importante na regulação dos fenótipos proliferativo e migratório das vSMCs (Kotha et al., 2009).

Nas vSMCs a CD9 associa-se com várias integrinas β_1 incluindo o recetor da fibronectina $\alpha_5\beta_1$ (Kotha et al., 2009; Scherberich et al., 1998).

Nas células endoteliais, o papel da CD9 ainda não é, contudo, completamente compreendido. Tal como noutros tipos celulares, a CD9 provavelmente desempenha diferentes funções dependendo da sua localização subcelular e do tipo de proteínas associadas. Por exemplo, após a estimulação por TNF- α , a CD9 interage com ICAM-1 na membrana apical e, juntamente com

as Tspans CD81 e CD151 e com VCAM-1, forma plataformas adesivas para os leucócitos (Barreiro et al., 2005, 2008). Através da sua associação com a integrina $\alpha_2\beta_1$, a CD9 participa na regulação da paragem da proliferação das células endoteliais (Cailleteau et al., 2010). A ausência da CD9 impede a formação de novos vasos sanguíneos em diversos modelos, sugerindo um papel para esta Tspan na angiogénese (Cailleteau et al., 2010; Kamisasanuki et al., 2011). Um estudo recente indica que a CD9 é responsável por ligar fisicamente a JAM-A (*Junctional adhesion molecule-A*) à integrina $\alpha_v\beta_3$ para formar um complexo ternário que medeia a ativação da MAPK regulada por bFGF, a migração de células endoteliais e a formação de túbulos (Peddibhotla et al., 2013).

A CD151 (Tspan24) é amplamente expressa nas células endoteliais, vSMCs e células epiteliais, e ainda em células hematopoiéticas como as plaquetas e megacariócitos (F. Zhang et al., 2009). A CD151 forma a “rede tetraspanin” com integrinas como $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$ e $\alpha_6\beta_4$, recetores de membrana, moléculas de sinalização intracelular como a PI4K e a proteína cinase C (PKC), proteínas da superfamília das Ig e com outras Tspans como CD9, CD81 e CD63 (Kumari, V, Badana, & Ramesh, 2015). A associação com CD9 e CD81 forma uma rede que permite a expressão das propriedades adesivas de ICAM-1 e de VCAM (Vasse et al., 2015).

As principais funções da CD151 são a manutenção da integridade das células epiteliais, cicatrização de feridas, agregação plaquetária, regulação da fusão e tráfego de membranas, adesão e contacto intercelular, motilidade das células endoteliais, angiogénese e metastização tumoral (Kumari et al., 2015; W. F. Liu et al., 2011).

As células endoteliais derivadas de murganhos com perda-de-função de CD151 apresentam defeitos funcionais em diversos ensaios *in vitro* destinados a medir a dispersão, migração e formação de túbulos, sugerindo assim uma função para esta Tspan na angiogénese (Y. Takeda et al., 2007). Defeitos na formação bi-dimensional de túbulos foram também verificados após a deleção genética da CD151 em células endoteliais microvasculares humanas (F. Zhang et al., 2011) e em HUVECs (Bailey et al., 2011).

A administração de CD151 conduz ao aumento do número de microvasos no miocárdio isquémico e parece melhorar a função cardíaca (Zheng & Liu, 2006). Conclusões semelhantes foram obtidas de um estudo de acompanhamento em que se utilizou um modelo suíno de enfarte do miocárdio (Houjuan Zuo et al., 2009) e num modelo de isquémia do membro posterior de rato verificou-se também que a administração da CD151 conduzia ao aumento da densidade capilar (Lan, Liu, Liu, Song, & Wang, 2005; W. F. Liu et al., 2011).

Contudo, os mecanismos angiogénicos induzidos por CD151 permanecem desconhecidos. Uma hipótese levantada é a de que a CD151 possa exercer estes efeitos angiogénicos através do complexo CD151-integrina (W. F. Liu et al., 2011).

Resultados recentes vieram demonstrar efeitos opostos das integrinas $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$, através da sua ligação diferencial à CD151, na diferenciação das células estaminais embrionárias (CEEs) em células endoteliais (Toya et al., 2015).

A MT1-MMP desempenha um papel fundamental na função endotelial. Nas junções endoteliais laterais, a MT1-MMP co-localiza-se com a CD151 e com a sua integrina parceira $\alpha_3\beta_1$. Dados recentes evidenciam um papel regulador dos microdomínios desta Tspan na atividade colagenolítica da MT1-MMP e indicam que a CD151 é um regulador chave da MT1-MMP na homeostasia endotelial (Yañez-Mó et al., 2008). Além da CD151, a MT1-MMP também interage estavelmente com outras Tspans (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 e CD82). Todas estas Tspans podem afetar diferencialmente a localização de MT1-MMP na superfície celular e a sua capacidade para ativar a pro-MMP-2 e a capacidade de invasão do colagénico. Contudo, as Tspans parecem influenciar de forma distinta a função e localização sub-celular da MT1-MMP podendo desse modo constituir um mecanismo eficiente de controlo da proteólise dependente da MT1-MMP na superfície celular (H. M. Schröder, Hoffmann, Hecker, Korff, & Ludwig, 2013).

Nas células endoteliais, a CD63 (ou Tspan30) foi identificada como um componente dos corpos Weibel-Palade (Hannah, Williams, Kaur, Hewlett, & Cutler, 2002; Vischer & Wagner, 1993) que armazenam e secretam o fator de Von Willebrand (vWF) (F. Zhang et al., 2009).

Diversas linhas de evidência sugerem que a CD63 esteja funcionalmente envolvida na adesão das células vasculares (Berdichevski, Bazzoni, & Hemler, 1995; Skubitz, Campbell, Iida, & Skubitz, 1996; D. A. Smith, Monk, & Partridge, 1995; Toothill, Van Mourik, Niewenhuis, Metzelaar, & Pearson, 1990). Após o tratamento com anticorpos anti-CD63 ou em condições de sobreexpressão de CD63, foram verificadas alterações na motilidade celular pelo que esta Tspan parece ainda estar envolvida na regulação da migração celular (Mantegazza et al., 2004; Radford, Thorne, & Hersey, 1997). A CD63 também se associa com a MT1-MMP para facilitar a sua degradação lisossomal (Takino et al., 2003) e funciona como um recetor celular do inibidor tecidual da metaloproteinase 1 (TIMP-1 – *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1*) (Jung, Liu, Chirco, Fridman, & Kim, 2006).

O silenciamento da CD63 em células endoteliais primárias impede o brotamento capilar e a formação de túbulos *in vitro* por prejudicar a adesão e migração celular. Esta Tspan parece servir como uma ponte entre a integrina- β_1 e o VEGF-R2 uma vez que o silenciamento de CD63 impede a formação do complexo integrina- β_1 /VEGF-R2 e atenua a sinalização a jusante. A CD63 parece ainda ser necessária para a internalização eficiente do VEGF-R2 em resposta ao VEGF. Saliente-se que, em pulmões de ratinho deficientes em CD63, a administração

sistêmica de VEGF é incapaz de induzir a fosforilação e sinalização a jusante do VEGF-R2 (Tugues et al., 2013).

As Tspans que apresentam oito resíduos de cisteína na sua EC2 (Tspan5, Tspan10, Tspan14, Tspan15, Tspan17 e Tspan33) são referidas coletivamente como o subgrupo TspanC8. Estas Tspans parecem ter uma função conservada na regulação do tráfego e atividade de ADAM10 regulando a sua saída do retículo endoplasmático (RE) e controlando diferencialmente a sua marcação quer para endossomas tardios quer para a membrana plasmática (Haining et al., 2012). De acordo com o papel chave da ADAM10 na mediação da clivagem dos recetores Notch, e consequente libertação do NICD, as TspanC8 estão envolvidas na regulação da ativação dos recetores Notch (Dornier et al., 2012).

As Tspans podem ser um componente central para a ligação e integração de exossomas em diferentes células-alvo. Para as células endoteliais, uma das moléculas “mestre” é a Tspan8 desde que a célula de origem expresse os parceiros de cooperação apropriados, como CD49d. A captação de exossomas com o complexo Tspan8-CD49 pelas células endoteliais é acompanhada pelo aumento da proliferação, migração, brotamento destas células e por maturação das células progenitoras endoteliais (Nazarenko et al., 2010).

A Tspan8 é fortemente expressa pelas células endoteliais que vascularizam os tumores e é a libertação, pelas células tumorais, de exossomas com Tspan8 que induz a forte expressão de Tspan8 pelas células endoteliais (Gesierich, Berezovski, Ryschich, & Zöller, 2006; Nazarenko et al., 2010).

Dada a versatilidade funcional das Tspans, as suas funções efetoras específicas podem ser únicas ao sistema vascular. No futuro será importante determinar, através do uso extensivo de diversos modelos vasculares, os mecanismos exatos das funções vasculares das Tspans (F. Zhang et al., 2009).

É provável que um conhecimento mais compreensivo da organização molecular das Tspans, particularmente, a identificação de mais pares tetraspanin-proteína parceira, possa ajudar na resolução de algumas das questões pendentes. Contudo, há ainda que considerar que algumas Tspans podem desempenhar funções por si próprias sem necessitarem de uma proteína parceira (Charrin et al., 2014; F. Zhang et al., 2009).

As características de expressão e os papéis funcionais de muitas Tspans humanas novas e menos estudadas, no sistema vascular são ainda pouco claras e deverão tornar-se uma das principais áreas de investigação nos próximos anos. A investigação translacional que relaciona as Tspans com a patologia vascular, fornecerá conhecimentos úteis para a descoberta de medidas preventivas, marcadores de diagnóstico e agentes terapêuticos para doenças vasculares (F. Zhang et al., 2009).

2.2.2. Tetraspanins na biologia tumoral

A presença de Tspans na superfície de células tumorais foi detetada há mais de 20 anos e a sua expressão encontra-se correlacionada com o prognóstico tumoral (Vasse et al., 2015).

A inibição de Tspans igualmente presentes na superfície das células tumorais permite, em determinados casos, limitar o crescimento tumoral e a formação de metástases (Vasse et al., 2015). Por outro lado, as Tspans podem também promover o crescimento tumoral (e/ou a metastização) por facilitarem a angiogénese (Hemler, 2014). Os diversos dados atualmente disponíveis, permitem considerar a utilização dos constituintes dos TEMs, presentes na superfície das células endoteliais, como potenciais alvos a investigar no desenvolvimento de novas terapias para inibir a angiogénese tumoral (Vasse et al., 2015).

Assim, a possível eficácia da inibição das Tspans no crescimento tumoral, não resultará apenas do seu efeito anti-angiogénico, mas também de uma ação direta sobre as células tumorais (Vasse et al., 2015). Uma vez que as Tspans podem modular as interações entre células tumorais e células endoteliais (Longo et al., 2001; Y. Takeda et al., 2011a), podemos esperar que estas novas terapias, que têm como alvo as Tspans, inibam o mimetismo vascular, uma das causas de desenvolvimento de resistência nas terapias anti-angiogénicas (Qu, Guo, Ma, & Lv, 2010).

As Tspans tumorais podem ser divididas em dois grupos: as que induzem a progressão e/ou iniciação tumoral, tais como a CD151 e a Tspan8 (C0-029) e aquelas que os inibem, nomeadamente a CD9 e a CD82.

Murganhos nulos para CD151 apresentam redução do crescimento *in vivo* de células LLC implantadas, acompanhado da redução da angiogénese tumoral (Y. Takeda et al., 2007). Contudo, em três modelos tumorais murinos, induzidos por transgenes diferentes, a angiogénese não se apresentou diminuída em murganhos nulos para CD151 (Copeland, Bowman, & Ashman, 2013; X. Deng et al., 2012; Q. Li et al., 2013). Deste modo, a CD151 parece facilitar seletivamente a angiogénese quando as condições são mais agudamente perturbadoras para o murganho, nomeadamente, situações que envolvam a administração de células tumorais, *pellets* ou factores de crescimento (W. F. Liu et al., 2011; Y. Takeda et al., 2007; Hou-juan Zuo et al., 2009).

A CD151 encontra-se sobrerregulada em diversos tipos de cancro humano e está frequentemente associada a maior metastização e/ou pior prognóstico (Hemler, 2014). Por exemplo, em amostras de carcinoma de células escamosas (SCC) humanas existe uma sobrerregulação seletiva e significativa da CD151 (Q. Li et al., 2013).

Trabalhos anteriores revelaram que a CD151 quer das células tumorais (Kohn, Hasegawa, Miyake, Yamamoto, & Fujita, 2002; Sadej et al., 2010; Zijlstra, Lewis, DeGryse, Stuhlmann,

& Quigley, 2008), quer do organismo “hospedeiro” (Y. Takeda et al., 2011a) pode promover a metastização de células tumorais (Hemler, 2014).

Em murganhos, a CD151 pode promover a metastização de células de melanoma (linha B16-F10) e de células LLC para os pulmões após a sua inoculação na veia da cauda (Y. Takeda et al., 2011a). O menor número de focos metastáticos em murganhos com perda-de-função de CD151 foi interpretado como sendo o resultado de deficiências funcionais nas células endoteliais, uma vez que já tinha sido verificado, *in vitro*, que células endoteliais sem CD151 são menos capazes de facilitar a adesão e migração transendotelial de células B16-F10 e apresentam redução da permeabilidade induzida pelas B16-F10 (Y. Takeda et al., 2011a). A observação de que CD151 pode associar-se à VCAM-1 dentro de estruturas de ancoragem de células endoteliais (Yañez-Mó et al., 2008) é bastante relevante, uma vez que a VCAM-1 pode ter um importante papel durante a adesão e metastização do melanoma (Rebhun et al., 2010). Em modelos transgênicos de cancro da mama (X. Deng et al., 2012) e da próstata (Copeland, Bowman, & Ashman, 2013), foi demonstrado que a CD151 provavelmente funciona quer nas células tumorais quer no microambiente tumoral para promover a metastização. Assim, em vez de alterar a taxa de crescimento, a CD151 parece estar envolvida na disseminação tumoral, através da promoção da extravasação e/ou intravasação (Hemler, 2014).

Contudo, num estudo recente, em murganhos MMTV/PyMT a deleção de CD151 resultou na redução significativa do número e tamanho dos tumores primários, mas não pareceu afetar o número ou o tamanho de focos metastáticos nos murganhos. Curiosamente, não foram observadas diferenças na expressão de marcadores de proliferação celular, apoptose e densidade de vasos sanguíneos nos tumores primários (Roselli et al., 2014).

Um estudo recente veio revelar a primeira evidência de que a Tspan CD151 pode suportar a carcinogénese *de novo* (Q. Li et al., 2013).

Também, em células tumorais epidermóides e da mama, a ausência de CD151 perturba as respostas celulares ao EGF, o que indica uma interrupção da sinalização dependente do EGFR (X. Deng et al., 2012; Q. Li et al., 2013). Uma vez que esta via de sinalização é fundamental para a promoção dos tumores da pele (Chan et al., 2004), a sua interrupção pode ser a causa da redução da promoção tumoral nos murganhos nulos para CD151 (Q. Li et al., 2013; Sachs, Secades, van Hulst, Song, & Sonnenberg, 2014).

Os níveis de CD151 também se apresentam aumentados em células tipo-estaminais iniciadoras de tumores no cancro da próstata (Rajasekhar, Studer, Gerald, Socci, & Scher, 2011) e no cancro da mama (Leccia et al., 2012), estando associada a um mau prognóstico nestes pacientes (Ang, Lijovic, Ashman, Kan, & Frauman, 2004). As células tipo-estaminais iniciadoras de tumores, de diversos tipos de cancro, expressam integrinas $\alpha 6$, que se associam tipicamente

com CD151. Deste modo, é de prever que os níveis de CD151 se encontrem aumentados nas células tipo estaminais de muitos tipos de cancro, e que esta Tspan possa contribuir para múltiplas etapas da carcinogénese (Hemler, 2014).

Apesar de CD151 não alterar as propriedades proliferativas das células tumorais prostáticas, promove a sua migração e invasão, sugerindo que esta Tspan desempenha um papel específico na promoção da motilidade das células tumorais prostáticas (Ang, Fang, Ashman, & Frauman, 2010).

A diminuição da expressão de CD151, parece ser responsável pelo aumento da metastização como resultado de uma diminuição das adesões intercelulares e entre células e matriz dependentes de CD151 (C.-W. Chien et al., 2008; Semenza, 2008). As integrinas $\alpha 6$ são maioritariamente pró-metastáticas, enquanto as integrinas $\alpha 3$ são mais frequentemente anti-metastáticas (Stipp, 2010; Varzavand et al., 2013). Assim, a CD151 pode afetar diferentemente o processo de metastização dependendo de estar a facilitar predominantemente as funções da integrina $\alpha 6$ ou $\alpha 3$ (Hemler, 2014).

Concluindo, foi já demonstrado *in vivo* que a CD151 apresenta funções de promoção tumoral tais como a iniciação tumoral, proliferação e sobrevivência celular (X. Deng et al., 2012; Q. Li et al., 2013; Sachs et al., 2014), crescimento tumoral primário (Franco et al., 2010; Sadej et al., 2009; X. H. Yang et al., 2008), metastização (Copeland, Bowman, & Ashman, 2013; Kohno et al., 2002; Sadej et al., 2010; Y. Takeda et al., 2011a; Zijlstra et al., 2008) e angiogénese (Y. Takeda et al., 2007).

Tal como para a CD151, também para a Tspan8 (ou D6.1A em ratos), existem evidências *in vivo* de que esta Tspan contribui para a angiogénese e metastização tumoral (Claas et al., 1998; Kengo Kanetaka et al., 2003) e já foi demonstrado que anticorpos específicos bloqueiam a angiogénese tumoral (Gesierich et al., 2006).

Tspan8 induz a migração de células neoplásicas ou angiogénese dependendo das integrinas expressas pela célula neoplásica. A indução da angiogénese domina na ausência da integrina $\alpha 6\beta 4$ e pode ser ativamente suprimida pela sua presença (Gesierich et al., 2006).

Uma vez que angiogénese tumoral pode ser iniciada por exossomas derivados das células neoplásicas, parece que a angiogénese mediada pela Tspan8 está relacionada com o seu recrutamento para exossomas (Zöller, 2009). Os exossomas libertados pelas células tumorais, e que apresentam maior quantidade de Tspan8, quando são internalizados pelas células endoteliais, induzem alterações genéticas que culminam na ramificação endotelial (Gesierich et al., 2006). Através dos exossomas secretados pelo tumor, que são enriquecidos com a integrina $\alpha 4$ e com VCAM-1, as células tumorais que expressam Tspan8, sobrerregulam a expressão do VEGF e do seu recetor, de quimiocinas e dos seus recetores, de vWF e da própria

Tspan8 nas células endoteliais, e de VEGF, MMPs e uPA (*urokinase plasminogen activator*) nos fibroblastos tumorais adjacentes (Gesierich et al., 2006; Nazarenko et al., 2010; Richardson, Jennings, & Zhang, 2011). Existem assim evidências de que as Tspans possam contribuir, por intermédio dos exossomas, para um maior alcance e distribuição de sinais angiogénicos (Hemler, 2014).

A maior expressão de Tspan8 encontra-se tipicamente em fases mais avançadas de diversos tipos de cancro e está relacionada com um mau prognóstico nestes pacientes (Gesierich et al., 2005; K. Kanetaka et al., 2001; Le Naour et al., 2006; Richardson et al., 2011; Szala et al., 1990; Z. Zhou et al., 2008).

A Tspan8 pode facilitar a migração celular e invasão através da regulação de transições cruciais entre a adesão intercelular e interações célula-MEC (Hemler, 2014). É mais provável que a Tspan8 contribua para a metastização quando a integrina $\alpha_6\beta_4$ também está presente (Herlevsen, Schmidt, Miyazaki, & Zöller, 2003). Esta associação é acompanhada pela internalização do complexo Tspan8-integrina que conduz à diminuição da adesão a laminina-5 e aumento da migração celular (Gesierich et al., 2005; Herlevsen et al., 2003).

A CD151 e Tspan8 promovem coordenadamente a metastização, onde a Tspan8 anula as propriedades adesivas da CD151 através do recrutamento de integrinas envolvidas na adesão para complexos promotores da motilidade. A CD151 é contudo mais eficiente do que Tspan8 no recrutamento e ativação da MMP-9 e da MMP-13 para criar um caminho para as células tumorais em migração (Yue, Mu, & Zöller, 2013).

Tspan12 pode desempenhar um papel na progressão tumoral por promover a maturação de ADAM10 uma protease facilitadora de tumores (D. Xu, Sharma, & Hemler, 2009). Foi demonstrado que Tspan12 pode suportar o crescimento tumoral através de um mecanismo que envolve o aumento da sobrevivência celular e que está associado à sinalização por FZD4/LRP5/ β -catenina. Contudo, não existem quaisquer evidências de que Tspan12 possa afetar o crescimento tumoral por outros mecanismos que envolvam o recrutamento de células mieloides, proliferação de células tumorais ou angiogénese. Por outro lado, a Tspan12 parece suprimir a metastização, provavelmente através da modulação da interação entre as células tumorais e as células endoteliais (Knoblich et al., 2014). Além disso, foi já demonstrado que a inativação de p53 nos fibroblastos contribui para a invasão e proliferação de células tumorais através da sobreexpressão de Tspan12 (Otomo et al., 2014).

Outra tetraspanin, a Tspan2, é também responsável pela motilidade e invasão celular elicitadas pela inativação de p53. A Tspan2 apresenta expressão elevada em células tumorais pulmonares com mutação em p53. Esta Tspan está envolvida na progressão de cancro do pulmão, nomeadamente nos processos de invasão, motilidade e metastização. A perda-de-função de

Tspan2 conduz à supressão da metastização para os pulmões e fígado, conduzindo a maior tempo de sobrevivência (Otsubo et al., 2014).

O papel da CD9 (ou Tspan29) no cancro é menos claro: se uma fraca expressão por parte das células tumorais representa um mau prognóstico nos tumores do pulmão e do cólon (Funakoshi et al., 2003; Hashida et al., 2003), uma maior expressão está correlacionada com um mau prognóstico nos tumores gástricos (Hori, Yano, Koufuji, Takeda, & Shirouzu, 2004).

Contudo, foi já determinado que a CD9 atua primariamente como um supressor da metastização (Cajot, Sordat, Silvestre, & Sordat, 1997; Kusakawa, Ryu, Kameyama, & Mekada, 2001; Miyake et al., 1995; Masayuki Miyake, Nakano, Itoi, Koh, & Taki, 1996; T. Takeda et al., 2007). Além disso, a CD9 pode também promover a angiogénese tumoral. Em murganhos com perda-de-função desta Tspan, observa-se um menor crescimento de tumores implantados (que expressam CD9) acompanhado de menor densidade microvascular tumoral que parece derivar de defeitos nas células endoteliais do murganho recetor (Iwasaki et al., 2013). Tal como os tumores implantados em murganhos nulos para CD151, também os implantados em murganhos nulos para CD9 apresentam uma angiogénese tumoral diminuída (Iwasaki et al., 2013; Y. Takeda et al., 2007).

Em murganhos transgénicos com perda-de-função de CD9, nem o início do desenvolvimento tumoral nem a angiogénese do adenocarcinoma prostático se apresentam reduzidos. Neste mesmo modelo, observou-se uma associação entre a perda da expressão de CD9 e o aumento da incidência de metástases no fígado, mas não no pulmão. Assim, apesar de não afetar o início do desenvolvimento tumoral primário na próstata, a perda de CD9 aumenta significativamente a incidência de metástases espontâneas, corroborando a função supressora da metastização desta tetraspanin (Copeland, Bowman, Boucheix, & Ashman, 2013).

O efeito inibitório na transmigração das células tumorais exercido por diversos anticorpos monoclonais anti-CD9 permite deduzir o envolvimento da CD9 no processo de transmigração das células tumorais. Os processos que podem contribuir para a inibição da migração transendotelial são o aumento da adesão das células tumorais às células endoteliais em monocamada e a promoção de uma forte adesão heterotípica célula endotelial-célula neoplásica, sem afetar a adesão a proteínas da matriz extracelular (Longo et al., 2001).

Apesar da já comprovada capacidade supressora da metastização, nalgumas circunstâncias a CD9 parece promover a invasão tumoral. O aumento da expressão da CD9 pode mesmo conduzir a um aumento na capacidade de invasão de células de melanoma *in vitro* (Fan, Zhu, & Niles, 2010) e esta Tspan apresenta ainda maior expressão nas células em pontos de invasão transendotelial de tecido de carcinoma cervical humano (G. Sauer et al., 2003). Além disso, a expressão da CD9 no cancro gástrico correlaciona-se com um mau prognóstico (Hori et al.,

2004; Soyuer et al., 2010). Estas funções aparentemente opostas da CD9, em diferentes tipos tumorais, podem dever-se a associações com diferentes proteínas parceiras (Hemler, 2014).

A CD82 (ou Tspan27) é amplamente expressa nos tecidos epiteliais, mas a sua expressão é frequentemente reduzida ou perdida durante a progressão tumoral. Os níveis desta Tspan normalmente estão inversamente correlacionados com o prognóstico dos pacientes em diversos tipos de tumores sólidos (Dong et al., 1995; Jackson, Marreiros, & Russell, 2005; W. M. Liu & Zhang, 2006; Malik, Sanders, & Jiang, 2009; Miranti, 2009; Tonoli & Barrett, 2005).

Na maior parte dos estudos até agora realizados em modelos animais, a CD82 inibe a metastização tumoral sem contudo afetar a proliferação do tumor primário (Abe et al., 2008; Adachi et al., 1996; Dong et al., 1995; W. M. Liu & Zhang, 2006; Miranti, 2009; Protzel, Kakies, Kleist, Poetsch, & Giebel, 2008; Tonoli & Barrett, 2005; X. Yang et al., 2001).

A expressão forçada de CD82 em células tumorais da próstata, mama e fígado, assim como em células de melanoma e fibroblastoma, suprime significativamente a metastização (Bari et al., 2009; Dong et al., 1995; Takaoka et al., 1998; Jian-min Yang et al., 2008; X. Yang et al., 2001).

A nível celular, a CD82 inibe diretamente a migração e/ou invasão das células tumorais (W. M. Liu & Zhang, 2006). Esta Tspan desregula a organização da actina, inibindo assim os processos de protrusão e retração celular nas células em migração. A CD82 também inibe indiretamente a motilidade celular por elevar a adesão intercelular (Abe et al., 2008).

A nível molecular, a CD82 altera as funções ou atividades das moléculas de membrana como as integrinas EGFR, c-MET e uPAR, algumas das quais associam-se com a CD82 em TEMs e modulam o seu tráfego ou compartimentalização membranar (Bass et al., 2005; He et al., 2005; Odintsova, Sugiura, & Berdichevski, 2000; Sridhar & Miranti, 2005). Foi também descrito que a expressão de CD82 tem capacidade para reduzir a atividade enzimática da MMP-9 e aumentar os níveis de TIMP-1 (Jee et al., 2006).

Apesar de a CD82 ser um exemplo convincente de que o bloqueio da migração é suficiente para prevenir a metastização, é importante notar que a CD82 inibe a migração por se associar diretamente, ou através de integrinas, com uma multitude de diferentes moléculas. O sistema torna-se ainda mais complexo através do recrutamento de moléculas parceiras em TEMs, nos quais os gangliósidos também vêm a desempenhar um papel que pode apoiar ou contrariar a atividade proibitiva da metastização de CD82 (Zöller, 2009).

Concluindo, os avanços no nosso conhecimento sobre a bioquímica das Tspans e sobre a sua participação na biologia tumoral, juntamente com os avanços tecnológicos nas abordagens terapêuticas, deverão conduzir-nos a uma validação *in vivo* adicional dos benefícios antitumorais de utilizar as tetraspanins e as proteínas associadas como alvos terapêuticos (Hemler, 2014).

2.2.3. Tetraspanin18

2.2.3.1. Localização

Nos humanos o gene para a Tspan18, localiza-se no cromossoma 11 (11p11.2 – braço curto do cromossoma 11, na região 11, banda 2) na cadeia codificante; a sequência de ARNm referência (NM_130783.4) tem 9 exões, que perfazem 4235 pb; o codão ATG localiza-se no 3º exão. Dos 9 exões, apenas 7 são codificantes para uma proteína com 248 aa (NP_570139.3 (CCDS7910.1)) (NCBI, 2015a).

No murganho (*Mus musculus*), o gene para a Tspan18, localiza-se no cromossoma 2 (2E1) na cadeia complementar (ou cadeia molde), entre as bases 93201760-93334505 (NCBI Reference Sequence: NC_000068.7) da sequência de ADN referência para *Mus musculus* com fundo genético C57BL/6J, GRCm38.p3. A sequência de ARN mensageiro referência (NM_183180.2) tem 10 exões, que perfazem 3751 pb; o codão ATG localiza-se no 4º exão. Dos 10 exões, apenas 7 são codificantes para uma proteína com 248 aa (NP_899003.1 (CCDS38182.1))(NCBI, 2015b).

2.2.3.2. Expressão conhecida

Através da utilização de uma sonda ARN *antisense* marcada com digoxigenina, visualizada com fosfatase alcalina, em crioseções de material recém-congelado e fixado em 4% paraformaldeído (PFA) durante 20' foi estudada a localização da expressão de *Tspan18* em embriões no dia embrionário (E) 14,5 e no E15,5. No E14,5, classificado como o estágio 23 de Theiler, verificou-se um nível moderado de marcação com um padrão uniforme na camada ventricular do telencéfalo, na camada ventricular do hipotálamo e na camada ventricular da parede lateral do diencéfalo (Diez-Roux et al., 2011; GXD, 2010; C. M. Smith et al., 2014). No E15,5, também classificado como o estágio 23 de Theiler, verificou-se a presença de marcação na vesícula renal, notando-se níveis de expressão enriquecidos neste tecido, e também na região do metanefros, pelo que a expressão de Tspan18 está presente em compartimentos metanéfricos além da vesícula renal (Brunskill et al., 2008; GXD, 2011; C. M. Smith et al., 2014).

De acordo com dados do IMPC (*International Mouse Phenotyping Consortium*), o gene *Tspan18* codifica uma proteína envolvida na regulação do desenvolvimento, ativação, crescimento e motilidade celular.

De acordo com o IMPC, nos mutantes homozigóticos nulos (*Tspan18^{-/-}*) ambos os sexos apresentam anomalias fenotípicas significativas no sistema hematopoiético e apenas as fêmeas apresentam anomalias fenotípicas a nível do metabolismo/homeostasia (International Mouse Phenotype Consortium, 2015). Nesta base de dados não existem dados sobre este mutante no

que diz respeito a alterações na embriogénese ou alterações anatómicas gerais, alterações do aparelho urinário/renal, do aparelho respiratório, do sistema muscular ou do fígado.

Resultados de uma análise estatística preliminar (uma vez que os dados ainda estão a ser sujeitos a um processo de controlo de qualidade e os resultados podem variar) para um nível de significância (p) inferior a 0,05, indicam que existem alterações significativas nos animais homozigóticos, e sem dimorfismo sexual, a nível do sistema nervoso, do sistema auditivo/vestibular, do crescimento/tamanho corporal, do sistema cardiovascular, do sistema hematopoiético, comportamentais/neurológicas e da visão/olhos. Existem alterações significativas nos animais homozigóticos, com dimorfismo sexual a nível do sistema imunitário e da homeostasia/metabolismo (International Mouse Phenotype Consortium, 2015).

Alterações a nível do integumento, da pigmentação, membros, dígitos e cauda, tecido adiposo, alterações craniofaciais, do aparelho reprodutor, esqueléticas, da mortalidade ou envelhecimento foram estudadas mas não foram verificadas alterações significativas para um nível de significância $p < 0,05$ (International Mouse Phenotype Consortium, 2015).

A título de exemplo podemos especificar algumas das alterações significativas observadas. No sistema cardiovascular verificou-se um aumento da frequência cardíaca média. No sistema hematopoiético, análise hematológicas revelaram concentrações anormais da hemoglobina corpuscular média e um aumento do volume corpuscular médio. No sistema imunitário verificaram-se contagens de leucócitos, células T e células *natural killer* (NK) superiores à média dos controlos. Em termos de homeostasia/metabolismo, a bioquímica sanguínea revelou níveis anormais de albumina sérica circulante, aumento dos níveis de sódio circulante e diminuição dos níveis de insulina em circulação; no teste de tolerância à glucose os mutantes revelaram um aumento da glicémia em jejum. Em termos de crescimento/tamanho corporal verificou-se um menor comprimento corporal médio nos animais mutantes (International Mouse Phenotype Consortium, 2015).

Estas alterações fenotípicas, em mutantes com perda-de-função constitutiva de Tspan18 não revelaram qualquer função vital desta tetraspanin na embriogénese uma vez que não se verificaram alterações a este nível. Podemos assim deduzir que a Tspan18 possivelmente não tem um papel fundamental durante a vasculogénese. Estes mutantes com perda-de-função constitutiva não permitem, contudo, o estudo do envolvimento desta proteína em processos angiogénicos fisiológicos ou patológicos durante a vida adulta.

2.3. O murganho como modelo experimental

2.3.1. Princípios da utilização de modelos animais

2.3.1.1. O conceito de modelo animal. Tipos de modelos animais

A maior parte do nosso conhecimento no que diz respeito a bioquímica, fisiologia e endocrinologia geral, deriva de experiências animais, que idealmente deverão ser extrapoladas para o homem. Na maior parte das experiências, o animal, por isso, serve como um substituto do homem e é referido como um modelo animal. Definimos “modelo animal laboratorial” como: “um modelo em que a biologia ou comportamento normais podem ser estudados, ou no qual um processo patológico espontâneo ou induzido pode ser estudado e no qual o fenómeno se assemelha, pelo menos no que diz respeito a um aspeto, ao mesmo fenómeno em humanos ou noutra espécie animal”. Esta definição inclui o uso de animais como modelos de estudo do comportamento e biologia normal, contudo, a maioria dos modelos animais laboratoriais são desenvolvidos e usados para estudar a causa, natureza e cura de doenças humanas (Beynen & Hau, 2001).

Os modelos animais usados no estudo das doenças humanas podem ser divididos em diversos grupos: modelos induzidos (incluindo modelos transgénicos), modelos espontâneos, modelos negativos e modelos órfãos. Os modelos induzidos e espontâneos são os mais importantes (Beynen & Hau, 2001).

Nos *modelos animais induzidos*, uma doença é induzida experimentalmente, quer cirurgicamente quer pela administração de substâncias biologicamente ativas. Deste modo é obtida uma semelhança correspondente, em termos de sintomas e etiologia, àqueles que se esperam na espécie alvo. Interferindo com fatores ambientais, dietéticos, endócrinos, imunológicos ou infecciosos, foram criados modelos para um vasto leque de doenças e perturbações humanas. Um novo grupo de modelos animais induzidos são os animais transgénicos. O rápido desenvolvimento da engenharia genética tornou os animais transgénicos a categoria mais importante de modelos de doença. Até à data os murganhos são os animais transgénicos preferidos para fins de investigação, contudo, outras espécies, incluindo os peixes, têm recebido especial atenção. A produção de animais transgénicos contendo genes estranhos, pode resultar em problemas de bem-estar animal até aqui silenciosos; os investigadores deverão assim estar atentos a eventuais sinais de *stress* e dor nestes animais (Beynen & Hau, 2001).

Os *modelos animais espontâneos* de doença humana, são aqueles que exibem as variações genéticas que ocorrem naturalmente. Centenas de estirpes foram já analisadas e categorizadas demonstrando doenças espontâneas que refletem as do homem. É possível obter modelos espontâneos quer de estirpes *inbred* (geneticamente uniformes) quer de populações

reproduzidas aleatoriamente (heterogêneas, ou *outbred*) em que uma elevada percentagem dos animais é afetada pela doença (Beynen & Hau, 2001).

Contudo, apenas raramente os modelos animais espelham plenamente o estado humano de doença ou saúde. É frequentemente suficiente determinar a seleção de um modelo animal com base na semelhança entre homem e animal no que diz respeito ao fenómeno em estudo. Sempre que possível deverão utilizar-se diferentes tipos de modelos, espontâneos e induzidos, para a mesma condição, de modo a escrutinar os possíveis diferentes mecanismos envolvidos (Beynen & Hau, 2001).

2.3.1.2. Extrapolação

Apesar de aparentemente serem muito diferentes de nós, leveduras, moscas, minhocas, peixes-zebra, cães e ratinhos partilham muitos genes e vias moleculares com os humanos. Assim, estudando estes denominados “organismos-modelo”, os investigadores podem aprender muito sobre a biologia normal e doenças humanas (European Commission, 2010b).

Quando selecionamos um modelo animal é importante considerar o grau desejado de generalização dos resultados que iremos obter. A razão para extrapolar resultados para outras espécies baseia-se na homologia. A homologia refere-se à semelhança evolutiva entre estruturas morfológicas e processos fisiológicos entre diferentes espécies animais, mas também entre os animais e o homem. Apesar de terem ocorrido várias divergências ao longo da evolução ainda restam muitas semelhanças entre diversas espécies animais e o homem. Quando entramos no estudo de características muito específicas, é necessário escolher a espécie e a estirpe que demonstra total conformidade no que diz respeito a características anatómicas ou fisiológicas com a espécie para a qual os resultados vão ser extrapolados (Beynen & Hau, 2001).

A significância dos resultados de experiências realizadas em animais depende da seleção de um modelo animal adequado. Até que ponto os resultados podem ser depois “extrapolados” depende do tipo de modelo animal e da natureza da investigação. Não existem regras no que diz respeito à escolha de um modelo animal mais adequado nem regras para a extrapolação de resultados de um modelo para outra espécie animal ou para o homem. É, contudo, muito útil ter conhecimento de aspetos biomédicos comparativos relevantes (Beynen & Hau, 2001).

A extrapolação de animais para humanos deve ser sempre feita com reserva. Os resultados dos testes realizados em animais têm sempre de ser verificados com estudos em humanos (Beynen & Hau, 2001).

Quando se investiga a etiologia e terapia de doenças, a extrapolabilidade de um modelo animal é aumentada quando as doenças em estudo têm uma origem comum quer no homem, quer no animal experimental. Os testes em animais podem assim acelerar o progresso da investigação

para combater doenças no homem. Ao mesmo tempo que a observação destes fenómenos nos animais fornece ideias para a pesquisa dirigida em humanos, também torna a investigação muito mais segura (Beynen & Hau, 2001).

2.3.1.3. A seleção de modelos animais

Para o estudo de doenças específicas, a literatura disponível pode dar uma indicação dos modelos espontâneos/induzidos disponíveis. Quando um modelo animal adequado não está disponível, ou não existe, o investigador pode ter de considerar desenvolver ele mesmo um novo modelo, mas este processo pode consumir bastante tempo. Além das propriedades desejadas, o investigador terá de estudar possíveis reações patofisiológicas e possíveis implicações com o bem-estar animal. Isto aplica-se quer aos modelos induzidos, quer aos modelos espontâneos. O modelo desenvolvido terá depois de ser validado para demonstrar que pode de fato ser usado como um modelo para o homem (Beynen & Hau, 2001).

A maioria das estirpes *inbred* e dos modelos genéticos estão registados em catálogos internacionais e é relativamente fácil localizá-los e adquiri-los. Deve ser dada preferência, sempre que possível, a criadores de animais de laboratório especializados, pois os animais disponibilizados por estes criadores são geralmente mantidos sob controlo constante no que diz respeito ao estado microbiológico e qualidade genética (Beynen & Hau, 2001).

2.3.2. O murganho – *Mus musculus*

De todos os animais de laboratório, provavelmente nenhum contribuiu mais para o avanço do conhecimento que o murganho ou ratinho doméstico (*Mus musculus*).

Apesar de existirem espécies (como cães, porcos e primatas não-humanos) que são ainda mais próximas dos humanos que o ratinho doméstico, trabalhar com estes animais de maior porte é extremamente dispendioso e prende-se com questões éticas complicadas (European Commission, 2010b).

A extraordinária semelhança do murganho com os humanos em termos anatómicos, fisiológicos e genéticos torna-o a espécie experimental de eleição. De facto, 99% do genoma de *Mus musculus* é semelhante ao do humano tornando-o a espécie ideal para estudar a função dos genes humanos não só na saúde mas também em doenças oncológicas, cardiovasculares ou metabólicas (European Commission, 2010a; The Jackson Laboratory, 2014).

2.3.2.1. O ratinho na investigação biomédica

Mus musculus sp. desempenhou e continuará a desempenhar um papel insubstituível no avanço do nosso conhecimento da condição humana (MorseIII, 2007). Esta espécie tornou-se o modelo mamífero de eleição na investigação biomédica devido ao seu elevado grau de adaptabilidade e por ser extremamente semelhante aos humanos quer a nível genómico quer ao nível da patofisiologia de diversas doenças. Uma estirpe de ratinho com sintomas de doença relevantes constitui um modelo primário efetivo e eficiente para estudar quer a doença em si quer potenciais tratamentos (The Jackson Laboratory, 2014).

Os modelos murinos desempenham assim um papel fundamental no processo de desenvolvimento de novos fármacos. A FDA aconselha que o delineamento de ensaios para testar novos fármacos assente maioritariamente em medidas clínicas de eficácia. Os ratinhos são uma ferramenta custo-eficiente e fiável para acelerar a validação de novas terapias. A utilização de murganhos em ensaios pré-clínicos, permite estudar a absorção, metabolização, segurança e eficácia geral de novos medicamentos. A combinação de características únicas do ratinho dá aos investigadores uma ferramenta poderosa para a compreensão dos mecanismos de doença humana e avaliação de novas terapias farmacológicas (The Jackson Laboratory, 2014).

O número de murganhos usados na investigação biomédica continua a crescer rapidamente. A utilidade do murganho como modelo biomédico tem também sido promovida pelos avanços conseguidos na área da manipulação genética (Vandenberg, 2000).

Muitas doenças podem hoje ser modeladas através da alteração de genes específicos que sejam fundamentais a um normal processo biológico. Ratinhos “humanizados” podem ser modificados para receber amostras de tumores de pacientes humanos, apresentar mutações genéticas específicas ou até integrar um sistema imunitário humano. Todas estas possibilidades constituem a base para o desenvolvimento de novas terapias génicas para corrigir diretamente as funções de genes defeituosos ou até introduzir genes novos (The Jackson Laboratory, 2014). Por outro lado, estirpes altamente consanguíneas com características relevantes para o estudo de muitas doenças humanas importantes, ficaram disponíveis. Uma estirpe específica, designada por 129, e as suas subestirpes, tornaram-se valiosas quando foi descoberto que eram particularmente adequadas para a derivação de células embrionárias estaminais. Estudos envolvendo a manipulação genética direta das subestirpes de 129 permitiram produzir, através da tecnologia de “mutação dirigida” (*targeting*), ratinhos com características fenotípicas específicas assim como ratinhos nos quais genes de doenças humanas são expressos (Vandenberg, 2000).

2.3.2.2. Vantagens/razões para a utilização do murganho como modelo

Como vimos, entre as principais razões para utilizar o ratinho como organismo modelo, a mais importante é sem dúvida a sua extraordinária semelhança com os humanos. Apesar de existirem algumas diferenças fisiológicas e imunológicas (Mestas & Hughes, 2004), a sequenciação do genoma veio revelar que entre cerca de 30000 genes de humanos e ratinhos, apenas 300 (ou seja, 1%) são únicos em cada espécie (Waterston et al., 2002). Mais de 99% do genoma de *Mus musculus* é semelhante ao do humano, tornando a investigação na área da genética do ratinho particularmente aplicável a doenças humanas (The Jackson Laboratory, 2014).

Na construção do conhecimento científico, diversos organismos, mais simples, foram usados para modelar diferentes processos biológicos, como o ciclo e o destino celular, mas os murganhos são de longe os mais adequados para estudar quer a função normal quer estados patológicos dos sistemas imunitário, endócrino, nervoso, cardiovascular, músculo-esquelético, e outros sistemas fisiológicos complexos dos mamíferos. Todos os mamíferos partilham estes sistemas básicos e, tanto quanto sabemos, desenvolvem as mesmas doenças comuns associadas a cada um desses sistemas: cancro, aterosclerose, hipertensão, diabetes, osteoporose, glaucoma, entre outras. Todas estas doenças surgem naturalmente no murganho; aquelas que não existem, como a fibrose quística e Alzheimer, podem ser induzidas manipulando o genoma ou o ambiente dos murganhos (Paigen, 2002).

Os murganhos usados num determinado estudo normalmente partilham o mesmo fundo genético (são de uma estirpe *inbred* única ou são cruzados para um fundo genético para se tornarem congénicos para uma determinada estirpe). Por isso, todos os indivíduos são geneticamente idênticos, eliminando potenciais fatores de complicação como a variação genética e polimorfismos de um único gene (por exemplo, SNPs) (Doyle, McGarry, Lee, & Lee, 2012).

O ratinho é uma ferramenta custo-eficiente e fiável para acelerar a investigação e desenvolvimento. São animais pequenos, o intervalo inter-geracional é inferior a três meses e têm uma vida útil acelerada (um ano da vida de um ratinho corresponde aproximadamente a 30 anos humanos). As ninhadas normalmente são suficientemente grandes para permitir a rápida expansão das unidades experimentais em *cohorts* estatisticamente significativas. A sua alimentação é simples, o seu ciclo de luz diário pode ser regulado e as suas necessidades de alojamento podem ser satisfeitas num pequeno espaço a um custo relativamente baixo mantendo os custos globais, espaço e tempo necessários para realizar a investigação aceitáveis e controláveis (Doyle et al., 2012; European Comissão, 2010b; Paigen, 2002; Streba et al., 2012; The Jackson Laboratory, 2014).

Uma vez que se encontram alojados em condições idênticas estão normalmente sujeitos aos mesmo tipo de influências ambientais. Além disso, todos os animais envolvidos num determinado estudo são sujeitos a protocolos experimentais idênticos, sendo possível fazer uma avaliação completa de diversos parâmetros fisiológicos e uma análise histopatológica *post-mortem* (Doyle et al., 2012).

Outras características como resistência a infeções e elevada prolificidade fizeram do murganho o mamífero de eleição dos primeiros geneticistas (Hogan, Beddington, Constantini, & Lacy, 1994; Streba et al., 2012). Por serem usados há décadas na investigação, os cientistas detêm hoje um conhecimento detalhado da biologia e genética do ratinho e desenvolveram a par um vasto leque de ferramentas e técnicas para os estudar (Paigen, 2002). Entre estas temos as ferramentas de manipulação genética, muitas das quais ainda não estão disponíveis para mamíferos maiores (European Comission, 2010b).

A possibilidade de manipular o sistema imunitário permite utilizar os murganhos como hospedeiros de tecidos humanos normais ou alterados por processos patológicos. Além de tudo isto, os recursos genéticos disponíveis são excecionais: dezenas de estirpes *inbred*, centenas de mutações *single gene* e mapeamento genético por linhas congénicas e recombinantes *inbred*, rearranjos e fusões cromossómicas (Paigen 2002).

A variação natural observada entre estirpes *inbred*, constitui um sistema essencial para estudar doenças complexas que envolvem a interação de múltiplos genes, uma característica fundamental na investigação biomédica e nos ensaios de eficácia farmacológica. Como muitos dos genes responsáveis por doenças complexas como a aterosclerose e hipertensão, são partilhados entre ratinhos e humanos, a investigação em ratinhos é crucial para a identificação de fatores de risco genéticos na população humana. Mutações espontâneas que ocorrem naturalmente são muitas vezes responsáveis por afeções em murganhos muito semelhantes às causadas por doenças genéticas humanas (The Jackson Laboratory, 2014).

A capacidade que adquirimos para manipular diretamente o genoma de *Mus musculus*, de uma forma hereditária que segue os princípios de Mendel, é sem dúvida a ferramenta mais importante e poderosa na modelação de doenças específicas que se sabem ser causadas por alterações genéticas bem definidas. Por exemplo, a manipulação de genes envolvidos em diversos tipos de cancro humano permitiu a criação de centenas de modelos murinos de cancro, aumentando assim a nossa capacidade para identificar os alvos e desenvolver novos fármacos para o tratamento eficaz de diversas neoplasias (Paigen, 2002; The Jackson Laboratory, 2014). Nos últimos anos temos assistido ao crescente uso de modelos murinos geneticamente modificados (GEMM's – *Genetically Engineered Mouse Models*) na investigação e em estudos pré-clínicos (European Comission, 2010b). Esta abordagem permite aos cientistas criar novos

modelos e ferramentas experimentais com base na manipulação de genes específicos que se pensam ter um papel relevante na patologia de determinadas doenças (The Jackson Laboratory, 2014).

O ratinho continua a ser o único modelo mamífero no qual é tecnicamente possível gerar um organismo em que um gene específico é substituído pelo seu homólogo humano. Estes ratinhos humanizados produzem e vivem com a versão humana da proteína codificada. Hoje em dia, um gene murino pode ser substituído por uma versão mutada do gene homólogo humano, que se sabe estar associada a uma doença humana específica. Com estes modelos é assim possível avaliar a eficácia de um fármaco desenvolvido para se ligar à proteína humana alterada (European Commission, 2010b; Paigen, 2002)

Paralelamente, grandes avanços têm sido feitos na nossa capacidade para quantificar processos fisiológicos nos murganhos e a capacidade que adquirimos para fazer perfis de expressão genética promete avanços revolucionários na compreensão de fenótipos a nível molecular (Paigen, 2002).

2.3.3. Manipulação genética

Os murganhos podem ser geneticamente modificados por transgenes, mutações dirigidas e mutações retrovirais ou provirais (The Jackson Laboratory, 2016). Através destas técnicas é possível desenvolver linhas de murganhos transgênicos e linhas de murganhos mutantes. Outra forma de modificar o genoma dos murganhos é através da indução de mutações por agentes químicos.

Os murganhos transgênicos transportam um segmento de ADN exógeno/estranho incorporado no seu genoma por recombinação não-homóloga (por exemplo, através da microinjeção pronuclear), por infeção com um vetor retroviral ou por inserção homóloga (The Jackson Laboratory, 2016).

Para produzir uma linha de murganhos mutantes primeiro é necessário induzir a interrupção, substituição ou duplicação génica nas células estaminais embrionárias (CEEs) por recombinação homóloga entre a sequência de ADN exógena (normalmente um vetor plasmídico linearizado que inclui as modificações a introduzir) e o gene alvo endógeno. As células estaminais embrionárias modificadas são depois microinjetadas em blastocistos ou agregadas com embriões na fase de mórula de 8 células. Os embriões resultantes (quimeras) são transferidos para fêmeas pseudogestantes. A descendência quimérica com a mutação específica na sua linha germinativa é depois cruzada para estabelecer uma nova linha. Se um *locus* genético específico se torna não-funcional quer pela inserção de uma sequência de ADN irrelevante para interromper a expressão do *locus* codificante, quer pela deleção de informação

da sequência de ADN, a nova linha estabelecida é designada de *knockout*; se um locus genético específico é alterado pela substituição recíproca de sequências de ADN ou pela adição de uma sequência que normalmente existe, ou não, no *locus* genético endógeno, ou seja tem um gene novo ou um gene duplicado, a nova linha estabelecida é chamada de *knockin* (Doyle et al., 2012; The Jackson Laboratory, 2016).

Quando uma mutação genética resulta na perda completa, ou numa redução marcada da atividade de um determinado gene, diz-se que temos um murgancho com perda-de-função. Quando uma mutação genética confere uma nova atividade e/ou o aumento de atividade de um determinado gene, então diz-se que temos um mutante com ganho-de-função (Doyle et al., 2012)

Normalmente os murganchos transgênicos são murganchos com ganho-de-função e os murganchos mutantes são murganchos com perda-de-função. Mas também existem murganchos transgênicos com perda-de-função quando a integração aleatória do transgene interrompe a expressão de um determinado gene, e também existem murganchos mutantes com ganho-de-função, quando se introduz uma sequência genética que já existe sem interrupção de outro gene.

Os murganchos com mutações quimicamente induzidas são produzidos através da utilização de diversos tipos de agentes químicos. Um agente químico mutagênico bastante utilizado para induzir mutações pontuais é a etilnitrosourea (ENU). A mutagênese por ENU envolve a exposição de murganchos machos a este agente e o cruzamento com fêmeas não expostas. Os descendentes resultantes, muitos dos quais com mutações pontuais, são depois rastreados para detecção de fenótipos de interesse (The Jackson Laboratory, 2016).

2.3.3.1. Células estaminais embrionárias

As células estaminais embrionárias (CEEs) foram isoladas pela primeira vez a partir da massa celular interna do embrião normal de ratinho, na fase de blastocisto, em 1981, tendo-se demonstrado que se comportavam de forma semelhante às células estaminais isoladas dos teratocarcinomas (Evans & Kaufman, 1981; G. R. Martin, 1981). Pouco tempo depois, foi demonstrado que estas células tinham a capacidade de se diferenciar em vários tipos de tecidos nas quimeras, incluindo células da linha germinativa (Bradley, Evans, Kaufman, & Robertson, 1984).

Em 1986 foi reportada pela primeira vez a manipulação genética das CEEs. Robertson demonstrou que células da linha germinativa, derivadas das CEEs com retrovírus integrados, apresentavam sequências de ADN viral integradas no seu genoma (Robertson, Bradley, Kuehn, & Evans, 1986) e Gossler demonstrou que o gene de resistência à neomicina *neo^r* era transmitido da mesma forma (Gossler, Doetschman, Korn, Serfling, & Kemler, 1986).

Estava assim aberto o caminho para a realização de experiências que envolviam a introdução de mutações específicas em localizações específicas do genoma, através de recombinação homóloga nas CEEs. O gene *HPRT* foi primeiro a ser alterado desta forma (Doetschman et al., 1987; K. R. Thomas & Capecchi, 1987).

2.3.3.2. Recombinação homóloga

Quando um fragmento de ADN genómico é introduzido numa célula mamífera pode localizar e recombinar-se com sequências oligonucleotídicas endógenas homólogas. Este tipo de recombinação homóloga é o que permite realizar mutações genéticas dirigidas (*gene targeting*), um dos maiores triunfos na genética do desenvolvimento mamífero (Hasty, Abuin, & Bradley, 2000; Hogan, Beddington, Constantini, et al., 1994).

O *gene targeting* pode ser usado para interromper/deletar um gene, remover exões e introduzir mutações pontuais, quer de uma forma permanente, quer de uma forma condicional (Collins & Rossant, 2007).

A mutação genética dirigida pode ser conseguida utilizando vetores de *targeting* que são desenhados para recombinar com e mudar um *locus* cromossómico específico, mas pode também ser usado para qualquer gene, independentemente do seu tamanho ou da sua atividade transcripcional nas CEEs (Collins & Rossant, 2007). Os componentes mínimos de um vetor de *targeting* são sequências homólogas ao local de integração cromossómica desejado e um *backbone* plasmídico. Uma vez que a frequência de transfeção e a frequência de recombinação homóloga podem ser muito baixas, estes vetores devem também incluir marcadores de seleção positiva e negativa. Existem fundamentalmente dois tipos de vetores de *targeting*, os de substituição e os de inserção. Os de substituição têm um local de linearização fora das sequências de homologia enquanto os de inserção têm esse local de linearização dentro das sequências de homologia. Quando se usam vetores de substituição, a sequência do alelo recombinante final resulta de um processo de recombinação recíproca dupla, adquirindo todas as sequências mutantes que se encontravam entre os braços de homologia do vetor de *targeting*. Quando se usam vetores de inserção, ocorre uma recombinação recíproca única (inserção) com o alvo cromossómico homólogo, sendo a sequência do alelo recombinante final uma duplicação da homologia da sequência alvo separada pelas sequências heterólogas no *backbone* plasmídico (Hasty et al., 2000).

A recombinação homóloga ou tecnologia “*knockout*”, que consiste em modificar um único gene endógeno com uma cópia alterada do mesmo gene, foi descrita pela primeira vez, simultaneamente nos laboratórios de Mario Capecchi e Oliver Smithies (Capecchi, 1989; Koller & Smithies, 1989).

A tecnologia de *targeting* usada para criar *knockouts* (KO) pode ser empregue para substituir genes endógenos do ratinho por genes que codificam proteínas fluorescentes, permitindo aos investigadores recolher imagens e seguir o destino de tipos celulares específicos. Os genes murinos podem ainda ser substituídos por genes humanos para estudar a função de um gene ou possibilitar estudos num modelo mais semelhante ao homem (The Jackson Laboratory, 2014). Contudo, a interpretação dos fenótipos dos *knockouts* produzidos por mutações genéticas dirigidas é frequentemente limitada por diversos fatores. Primeiro, a presença de um marcador de seleção pode influenciar o fenótipo da mutação (Fiering et al., 1995; Olson, Arnold, Rigby, & Wold, 1996). Segundo, podem surgir artefactos devido à ausência de uma proteína codificada, durante todo o tempo de vida do animal. Terceiro, a inativação de um gene pode resultar em letalidade intra-uterina, impedindo a análise de possíveis funções do produto desse gene em fases mais tardias do desenvolvimento ou durante a vida adulta (Feil et al., 1996). Para ultrapassar estas limitações, foram desenvolvidos métodos de mutação genética dirigida condicional baseados na atividade induzível de recombinases do ADN modificadas. Estes métodos permitem a remoção dos marcadores de seleção e a inativação de genes alvo em momentos e locais (tecidos) específicos durante o desenvolvimento ou na vida adulta do murganho (Feil et al., 1996). Assim, existe hoje a capacidade de controlo espacial e temporal da expressão genética (The Jackson Laboratory, 2014).

2.3.3.3. Sistemas de recombinação sítio-específica

Os sistemas de recombinação sítio-específica mais simples são compostos por dois elementos: uma enzima recombinase e uma pequena sequência de ADN (alvo) que é especificamente reconhecida por essa recombinase. Estes dois elementos funcionam em conjunto para deletar, inserir, inverter ou translocar o ADN existente entre sequências alvo da recombinase (Dymecki, 2000).

A descoberta de que elementos genéticos de bactérias, fagos e leveduras funcionam em células eucariotas, sem alterar a sua fisiologia, permitiu um avanço importante na manipulação genética do murganho (Gossen, Molijn, Douglas, & Vijg, 1992; M. C.-T. Hu & Davidson, 1987; O’Gorman, Fox, & Wahl, 1991; Ornitz, Moreadith, & Leder, 1991; B. Sauer & Henderson, 1989).

A utilização de sistemas de recombinação sítio-específica, como os sistemas Cre-*loxP* do bacteriófago P1 (B. Sauer & Henderson, 1988; Sternberg & Hamilton, 1981) e o sistema FLP-*FRT* da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Broach & Hicks, 1980; Dymecki, 1996; Gerbaud et al., 1979), permite gerar mutações “limpas” nas células da linha germinativa após um evento

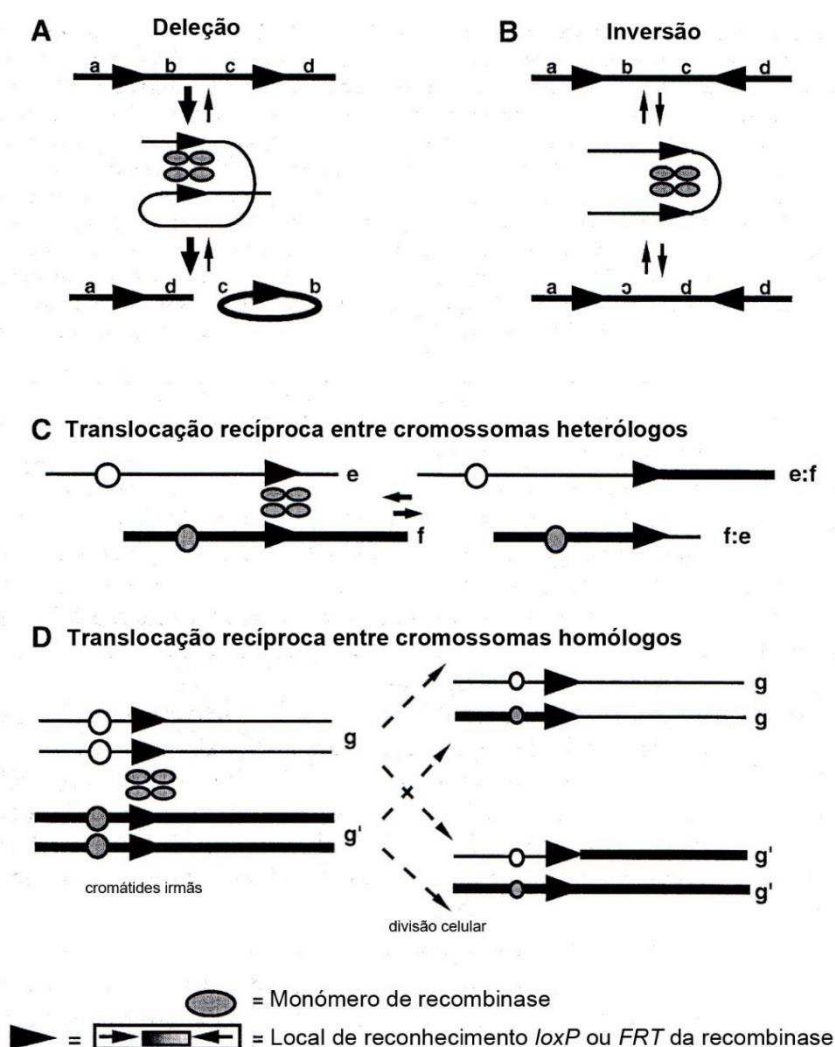
de *targeting* único, assim como (in)ativar genes de uma forma condicional no murganho adulto. Graças a estes sistemas, não só as mutações genéticas dirigidas podem ser induzidas de uma forma restrita no espaço e no tempo, mas também marcadores de linhagens podem ser ativados em populações progenitoras específicas para mapear o destino celular diretamente (Dymecki, 2000).

As recombinases Cre (*causes recombination*) e Flp são membros da superfamília de enzimas de recombinação sítio-específica λ integrase (Argos et al., 1986), que clivam o ADN em sequências alvo distintas e posteriormente ligam-no ao ADN clivado num segundo sítio idêntico para gerar uma cadeia contínua. Esta reação de recombinação ocorre com absoluta fidelidade sem ganho ou perda de um único nucleótido e sem requisitos adicionais além da recombinase, da sequência específica de ADN alvo e alguns catiões mono ou divalentes (Dymecki, 2000).

Quer para a recombinase Cre, quer para a recombinase Flp, as sequências oligonucleotídicas alvo, *loxP* (*locus of cross-over (x) in P1*) e FRT (*Flp recognition target*), respetivamente, têm 34 pares de base (pb) e características muito particulares (Dymecki, 2000). A ocorrência aleatória de uma sequência de ADN exatamente igual e com este tamanho é altamente improvável e requer uma extensão de 10^{18} pares de bases. O genoma mamífero inteiro tem apenas 3×10^9 pb. Assim, é altamente improvável que estes locais existam fora do genoma dos procariotas de origem (A. Nagy, 2000). Apesar de ser um tamanho que é pouco provável de ocorrer aleatoriamente mesmo no maior genoma vertebrado, é suficientemente pequeno para ser neutro em termos de expressão de outros genes quando é inserido no genoma, normalmente por transgenese (Dymecki, 2000).

Apesar de as sequências nucleotídicas serem diferentes, a estrutura geral dos elementos que compõem os locais *loxP* e FRT são semelhantes e incluem elementos simétricos invertidos que atuam como locais de ligação para monómeros das recombinases, e um núcleo assimétrico rico em A:T que constitui o local de clivagem, troca e ligação da cadeia. A assimetria da sequência central é crítica e define a orientação dos locais de reconhecimento. A existência de dois locais de reconhecimento repetidos, na orientação direta ($5' - 3'$), determina a excisão do fragmento de ADN entre eles (Figura 10A); a existência de um local de reconhecimento numa molécula de ADN circular e de um local de reconhecimento numa molécula de ADN linear determina a integração da molécula de ADN circular na molécula linear; a existência de dois locais de reconhecimento com orientação oposta (um $5' - 3'$ e outro $3' - 5'$) determina a inversão do fragmento de ADN entre eles (Figura 10B); a existência de locais alvo em moléculas de ADN linear separadas determina a troca mútua de segmentos de ADN a jusante dos locais alvo (Figura 10C, D) (Dymecki, 2000).

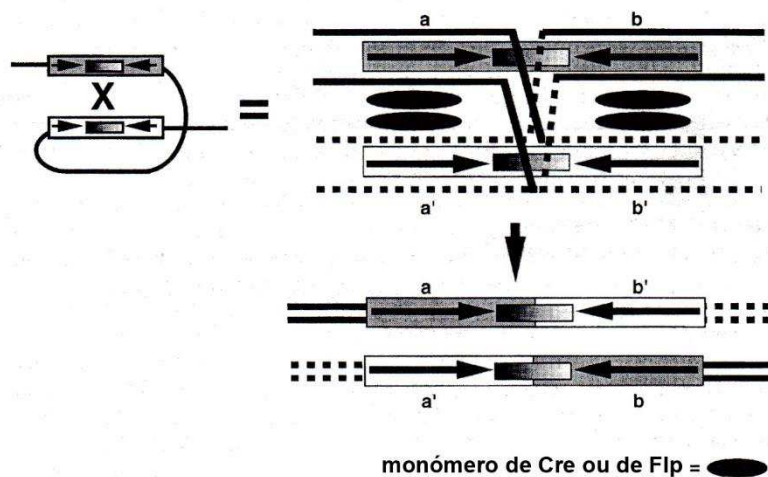
Figura 10 - Reações de recombinação catalisadas por Cre ou Flp. Os triângulos a negro indicam os locais de reconhecimento das recombinases; as linhas negras o ADN cromossômico, com a orientação indicada pelas letras a, b, c e d; as formas ovais cinzentas os monómeros de recombinase; as setas entre os substratos e os produtos das recombinases, indicam a natureza reversível de cada reação. Os locais alvo alinham-se produtivamente numa orientação estabelecendo a direcionalidade da reação. Desse modo, as recombinases Flp ou Cre excisam (A) uma molécula circular que se encontra entre dois locais alvo diretamente repetidos na mesma orientação e separados por pelo menos 82 pb, integram uma molécula circular numa molécula linear cada uma com um local alvo, ou invertem (B) a sequência de ADN entre os dois locais de reconhecimento invertidos, ou trocam sequências (C e D) distais aos locais alvo presentes em duas moléculas lineares. Este último tipo de recombinação intermolecular pode ocorrer entre cromossomas heterólogos (indicados em C pelas letras e e f) ou entre alvos em cromossomas homólogos após replicação do ADN (indicado em D pelas letras g e g'). Traduzido e adaptado de (Dymecki, 2000)



Nestes sistemas, uma única molécula de recombinase liga-se a cada metade palíndroma (simétrica) da sequência alvo; de seguida as moléculas de recombinase juntam-se num complexo sináptico, formando um tetrâmero que agrupa dois locais alvo existentes numa mesma cadeia de ADN ou em cadeias diferentes. A clivagem, troca e ligação de uma cadeia de ADN forma um intermediário *Holliday*; a clivagem, troca e ligação da segunda cadeia de ADN resolve o intermediário *Holliday* em duas moléculas recombinantes. Os locais alvo pós-

recombinacionais são formados pelas duas metades complementares dos locais pré-recombinacionais (Figura 11) (A. Nagy, 2000).

Figura 11 - Complexo sináptico formado entre moléculas de recombinase e dois locais alvo. Apesar de os dois locais alvo participantes serem idênticos, são aqui distinguidos por um retângulo cinzento e um retângulo branco. Os monômeros de recombinase (formas ovais a negro) ligam-se aos elementos de simetria no respetivo local alvo; dois locais alvo são assim juntos num complexo sináptico; a clivagem, troca e ligação de uma cadeia de ADN forma um intermediário *Holliday*; a clivagem, troca e ligação da segunda cadeia resolve o intermediário *Holliday* em duas moléculas recombinantes. No produto final, os braços de simetria dos dois locais alvo foram trocados e as regiões centrais dos dois recombinantes são heteroduplex. Traduzido e adaptado de (Dymecki, 2000).



No caso de deleções intracromossômicas, um local alvo recombinante permanece no cromossoma após a excisão de um fragmento de ADN, tornando a reação reversível. A reação de integração intermolecular é, contudo, menos favorecida energeticamente. Além disso, em condições *in vivo* o produto circular extracromossômico é perdido, tornando a reação de deleção efetivamente irreversível (Dymecki, 2000). A estratégia básica empregue para criar linhas de murganhos *knockout* condicionais é bastante simples e baseia-se na ausência destes sistemas de recombinação sítio-específica nos mamíferos. São utilizadas duas linhas de murganhos. Uma, que resulta da manipulação de CEEs por *gene targeting* e apresenta um gene de interesse ou exões funcionalmente importantes desse gene, flanqueado por sequências alvo da recombinase (Doyle et al., 2012; MorseIII, 2007). Por exemplo, os alelos *floxed* (flanqueados por locais *loxP*) são gerados usando um vetor de inserção que contém uma versão *floxed* do gene de interesse. É crítico que os locais *loxP* sejam inseridos em regiões do gene que não alteram a sua função, o que pode ser determinado gerando murganhos que são homozigóticos para o alelo *floxed* (estes murganhos deverão ser fenotipicamente normais) (E. L. Garcia & Mills, 2002). A outra, é uma linha transgénica gerada para expressar a recombinase correspondente sob o controlo de um promotor celular específico previamente caracterizado. Estas duas linhas são cruzadas para dar origem a uma descendência de murganhos *knockout* condicionais em que a recombinação

e, por sua vez, a deleção genética, ocorre apenas nas células que expressam a recombinase (Doyle et al., 2012; Dymecki, 1996; MorseIII, 2007; A. Nagy, 2000; Orban, Chui, & Marth, 1992; B. Sauer & Henderson, 1988).

2.3.3.4. Sistemas de recombinação induzível

Para ultrapassar a questão da letalidade embrionária ou precoce e/ou mimetizar as alterações na expressão gênica que precedem ou acompanham uma determinada doença, foram desenvolvidas várias linhas de murganhos transgênicos que permitem aos investigadores controlar não só a expressão de um gene de uma forma específica num determinado tecido ou tipo celular (controle espacial ou expressão condicionada), mas também iniciar esta alteração num momento que é determinado pelo investigador (controle temporal ou expressão induzível) (Günschmann et al., 2014) .

O controle espacial da inativação gênica depende do promotor que é usado para regular a expressão da recombinase. Diversos promotores específicos de tecidos ou tipos celulares têm sido usados para regular/condicionar a atividade da recombinase Cre (E. L. Garcia & Mills, 2002).

No caso do *gene targeting* endotelial, várias linhas Cre foram já desenvolvidas, com graus variáveis de especificidade (Alva et al., 2006; E. Gustafsson, Brakebusch, Hietanen, & Fässler, 2001; Kisanuki et al., 2001; Motoike, Markham, Rossant, & Sato, 2003). Apesar de extremamente informativas, a deleção de diversos genes com essas linhas resulta por vezes em hemorragias severas e, eventualmente, em letalidade embrionária. Por estas razões, foram desenvolvidos modelos em que a atividade da Cre é “induzível”. Estes modelos permitem-nos hoje avaliar a contribuição de genes específicos durante situações de homeostasia ou doença, em indivíduos adultos e até mesmo durante o desenvolvimento embrionário (Monvoisin et al., 2006).

Várias estratégias têm sido utilizadas para conseguir induzir a atividade da recombinase Cre num momento específico do tempo. Uma delas é associar ao gene Cre elementos regulatórios que se encontram ativos apenas durante um período muito específico do desenvolvimento embrionário. Apesar de este tipo de abordagem ser útil para prevenir a letalidade embrionária e para avaliar o fenótipo de alguns genes, a sua utilidade é limitada a apenas alguns tecidos e restrita a uma janela do desenvolvimento muito específica (E. L. Garcia & Mills, 2002).

Um maior controle sobre o momento da expressão gênica pode ser conseguido utilizando promotores induzíveis que usam ligandos específicos para ativar a recombinase Cre no momento desejado. Estes promotores dependentes de ligandos podem ser associados ao gene

Cre no vetor de transgenese para criar um sistema em que um gene é inativado precisamente no local e no momento desejado (E. L. Garcia & Mills, 2002).

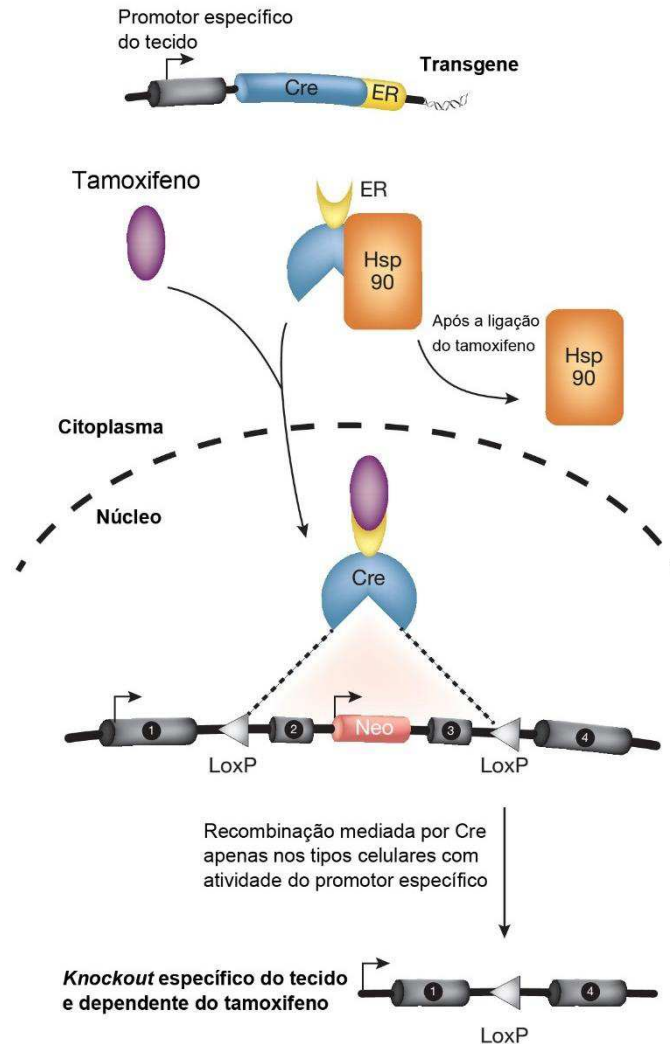
Um sistema com uma forma da recombinase Cre induzível deverá cumprir idealmente quatro requisitos: ausência de atividade basal da Cre na ausência do indutor, o indutor não interfere com as vias endógenas nem é tóxico para o animal, a presença do indutor resulta na presença de níveis elevados de Cre a qual produz uma excisão eficiente de um gene *floxed* em todas as células em que o promotor está ativo, o agente indutor não é tóxico, é facilmente adquirido e preparado, é barato e facilmente administrado (E. L. Garcia & Mills, 2002).

Vários tipos de promotores induzíveis têm sido usados para regular especificamente a expressão de Cre; cada um tem as suas vantagens e limitações (E. L. Garcia & Mills, 2002; Lewandoski, 2001).

O promotor *Mx1*, um promotor responsivo ao interferão (INF) (Kühn, Schwenk, Aguet, & Rajewsky, 1995), os sistemas com recetores de estrogénio e progesterona modificados que são induzidos por tamoxifeno (Feil et al., 1996) e mifepristona (RU486) (Kellendonk, 1996; Ngan, Schillinger, DeMayo, & Tsai, 2002), respetivamente, e o sistema de expressão induzível pela tetraciclina (St-Onge, Furth, & Gruss, 1996; Z. Zhu, Zheng, Lee, Homer, & Elias, 2002) são apenas alguns exemplos (E. L. Garcia & Mills, 2002). O recetor dos estrogénios (ER – *Estrogen Receptor*) é um recetor hormonal nuclear que se liga ao estrogénio, mas também a um antagonista sintético, o tamoxifeno. Na sua forma inativa, o ER encontra-se ligado à Hsp90 (*Heat shock protein 90*) e é por isso excluído do núcleo (Figura 12) (Günschmann et al., 2014). Quando o estrogénio ou o tamoxifeno se ligam ao domínio de ligação a hormona do ER, a Hsp90 é libertada e o ER pode ser translocado para o núcleo. Esta propriedade é utilizada para controlar a localização e atividade da recombinase Cre, que apenas se pode ligar e recombinar os locais *loxP* se estiver no núcleo. Através da fusão do gene que codifica a Cre com um gene que codifica o ER, a Cre é retida no citoplasma pela Hsp90 (Mattioni, Louvion, & Picard, 1994), numa forma inativa, na ausência de hormona. Por administração do tamoxifeno, a proteína de fusão Cre-ER é libertada da Hsp90 e pode então entrar no núcleo para realizar a recombinação/deleção do gene *floxed* (Figura 12).

Este sistema recorre a formas modificadas do ER (Danielian, White, Hoare, Fawell, & Parker, 1993; Feil, Wagner, Metzger, & Chambon, 1997; Leone et al., 2003; Metzger & Chambon, 2001) que não se ligam ao estrogénio endógeno mas que se ligam ao tamoxifeno ou outros análogos sintéticos (Günschmann et al., 2014).

Figura 12 - Sistema Cre-loxP induzível por tamoxifeno. O transgene é composto pelo gene *Cre*, um gene para um recetor de estrogénio (ER) modificado e um promotor específico do tecido alvo. No estado inativo, isto é, na ausência de ligando, a *Heat shock protein 90* (Hsp90) encontra-se ligada ao ER, retendo a proteína de fusão no citoplasma. Após a administração de tamoxifeno, a sua ligação ao ER da proteína de fusão, liberta a Hsp90, permitindo assim a translocação da proteína de fusão Cre-ER para o núcleo. No núcleo, a Cre recombina o alelo *floxed*. No exemplo aqui esquematizado, a recombinação resulta na deleção dos exões representados pelos números 2 e 3, e do gene *Neo*, mantendo os exões 1 e 4, que não são transcritos numa proteína funcional. Traduzido e adaptado de (Günschmann et al., 2014).



O ER^{T2} é um desses recetores de estrogénio modificado; funciona como um recetor específico para o tamoxifeno, mas não é responsivo aos estrogénios naturais ou a outros esteroides endógenos. A expressão da proteína de fusão Cre-ER^{T2} permite controlar a atividade da recombinase Cre com o ligando sintético 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT). A ligação de 4-OHT ao recetor modificado ER^{T2}, interrompe a interação com a Hsp90, permitindo a translocação da proteína Cre para o núcleo onde pode iniciar a recombinação entre locais *loxP* (Monvoisin et al., 2006).

Tendo a expressão das proteínas de fusão Cre-ER sob o controlo de um promotor específico de um determinado tipo celular ou tecido, é assim possível realizar a deleção génica de uma

forma controlada no tempo e no espaço. Note-se que, apesar de todas as células dos duplos mutantes terem o gene de interesse floxed, após a administração do tamoxifeno apenas ocorre excisão desse gene nas células que expressam especificamente a Cre (isto é, nas células que têm o promotor específico ativo), mantendo-se todos os outros tipos celulares inalterados. Assim, a deleção génica num tipo celular específico, é condicionada à expressão da Cre e induzível por tamoxifeno.

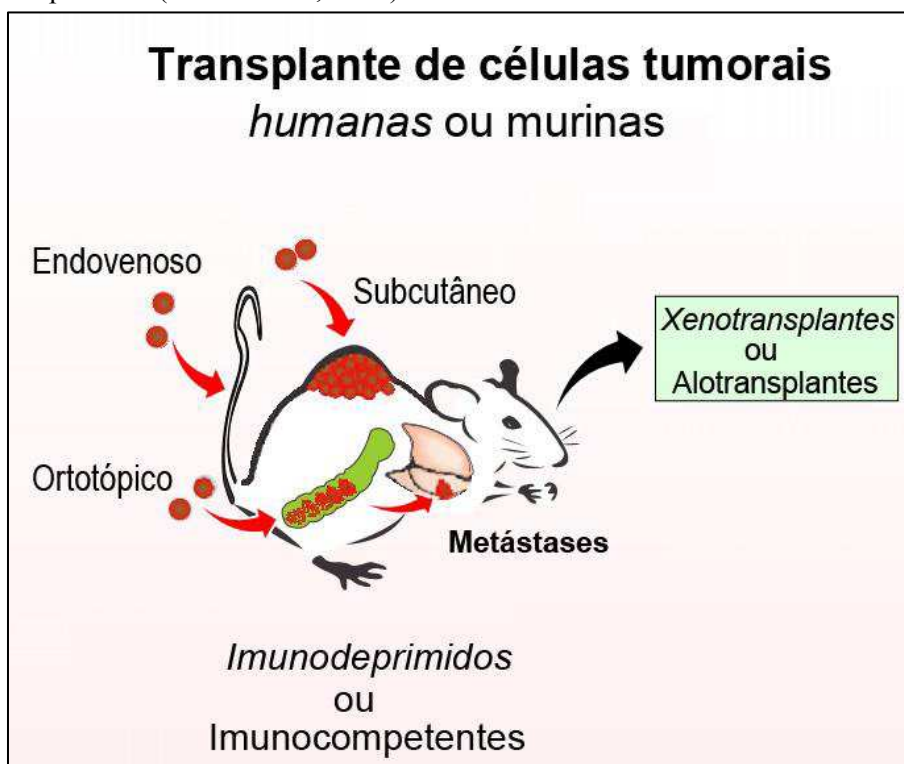
2.3.4. Modelos tumorais

Os modelos murinos tumorais têm constituído uma plataforma pré-clínica fundamental para testar a eficácia e segurança de novas abordagens terapêuticas dirigidas à vasculatura tumoral (Eklund et al., 2013).

O tipo de modelo tumoral que tem sido mais usado para analisar a angiogénese ou linfangiogénese tem sido o transplante de linhas celulares neoplásicas humanas ou murinas em murganhos imunodeprimidos ou murganhos isogénicos (singénicos) imunocompetentes, respetivamente (Figura 13).

A utilização de diversas linhas tumorais bem caracterizadas resulta na formação de um tumor em apenas algumas semanas. As células neoplásicas podem ser transplantadas para diferentes microambientes, frequentemente subcutâneos, para estudar o tumor primário, intravenoso para estudos de disseminação metastática, ou ortotópico, no órgão de origem das células malignas

Figura 13 - Tipos de modelos tumorais transplantados. Traduzido e adaptado de (Eklund et al., 2013).



de forma a mimetizar o crescimento tumoral no microambiente tecidular mais relevante (Figura 13) (Eklund et al., 2013; Loi et al., 2011).

A identificação de mutações responsáveis pela iniciação tumoral a par do desenvolvimento das técnicas de transgênesis e de *gene targeting*, permitiram o desenvolvimento de linhas de murganhos portadores dos mesmos defeitos genéticos implicados no desenvolvimento de vários tipos de cancro humano. Estão hoje disponíveis vários modelos murinos geneticamente modificados que sobre-expressam um oncogene, são deficientes ou têm uma mutação num gene supressor tumoral, ou têm uma mutação num gene específico que pode ser expressa de uma forma controlada no tempo e no espaço (Douglas Hanahan, Wagner, & Palmiter, 2007)

2.3.4.1. Transplantes tumorais

Uma das bases da investigação oncológica nos últimos 30 anos tem sido a utilização de linhas celulares ou tecidos neoplásicos que podem ser implantados em murganhos ou ratos (Khanna & Hunter, 2005). Estes métodos incluem vários sistemas e técnicas para propagar tecidos tumorais em diferentes hospedeiros para estudos controlados *in vivo*. Alguns destes métodos são usados já há décadas e são modelos bem estabelecidos, outros são mais recentes e continuam a ser desenvolvidos. Tal como com qualquer outro método, a interpretação dos resultados deverá ter em conta as limitações e benefícios do sistema e da estratégia em particular (National Cancer Institute, 2016).

Os modelos transplantáveis podem ser divididos em dois grupos gerais: os modelos singénicos (ou alogénicos) e os modelos xenogénicos (Khanna & Hunter, 2005).

Os modelos singénicos, também conhecidos como sistemas de alotransplantes tumorais murinos (Figura 13), referem-se a linhas celulares ou tecidos neoplásicos murinos que são transplantados num murganho hospedeiro de uma estirpe *inbred* que partilha o mesmo fundo genético com o animal de onde derivou a linha celular ou tecido neoplásico transplantado. Até recentemente, as linhas celulares neoplásicas singénicas eram derivadas de tumores induzidos por carcinogénicos ou de tumores que se desenvolviam espontaneamente num determinado murganho ou rato (Brown, Buchmann, & Balmain, 1990; Double, Ball, & Cowen, 1975; Khanna & Hunter, 2005; National Cancer Institute, 2016; Takayama, 1968). Nestes modelos os investigadores podem monitorizar os tecidos para identificar alterações como crescimento ou regressão, metastização e taxa de sobrevivência (National Cancer Institute, 2016).

Contudo, estes modelos não têm muitas das características importantes dos tumores humanos. A mesma propriedade que pode ser considerada uma vantagem, o fundo genético *inbred*, pode também representar uma desvantagem. Como as células neoplásicas são normalmente derivadas de um murganho *inbred* homozigótico, não apresentam a complexidade genética dos

tumores humanos. Além disso, devido a diferenças específicas da espécie na oncogénese, por exemplo, diferenças no metabolismo de carcinogénicos xenobióticos, podem não ser portadoras da mesma constelação de mutações observadas nos pacientes humanos (Gonzalez & Kimura, 2001; Khanna & Hunter, 2005; National Cancer Institute, 2016).

Os modelos xenogénicos (ou de xenotransplantes) referem-se a linhas celulares ou tecidos neoplásicos humanos que podem ser transplantados em animais imunodeprimidos e crescer efetivamente como tumores. Os tumores resultantes são normalmente um mosaico de células neoplásicas humanas e de células de estroma murinas (Khanna & Hunter, 2005). Estes modelos foram estabelecidos graças ao desenvolvimento e disponibilização de hospedeiros imunodeprimidos para prevenir a rejeição imunitária. Em particular, os murganhos atímicos *nude* (Brünnner, Boysen, Rømer, & Spang-Thomsen, 1993; Fidler, 1986; Giovanella & Fogh, 1985; Neulat-Duga et al., 1984; Rygaard & Poulsen, 2009; Sharkey & Fogh, 1984) e subsequentemente os murganhos SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*) (Hendrickson, 1993; Phillips, Jewett, & Gallie, 1989) e outras estirpes de murganhos com uma imunodepressão ainda mais significativa (por exemplo, os murganhos SCID-Beige, em que a mutação *beige* elimina a função das células NK) (Clarke, 1996; Khanna & Hunter, 2005; Welch, 1997) têm sido amplamente utilizados. Adicionalmente, outros hospedeiros imunodeprimidos, como o embrião de galinha, têm também sido usados (A. F. Chambers & Ling, 1984; Easty, Easty, & Tchao, 1969; Welch, 1997).

Uma das vantagens dos xenotransplantes é empregarem amostras tumorais humanas reais de pacientes com cancro. Como os tumores carregam material genético humano, podem ser mais representativos das propriedades e mutações do cancro humano (National Cancer Institute, 2016). Contudo, o contexto de imunodepressão pode não mimetizar a situação em pacientes reais e impede o estudo do papel do sistema imunitário na progressão tumoral (Khanna & Hunter, 2005; National Cancer Institute, 2016). Além da imunodepressão, existem ainda propriedades específicas de cada estirpe de murganho imunodeprimida que podem influenciar a biologia e o estudo da metastização (Garofalo et al., 1993; Mueller & Reisfeld, 1991) (Khanna & Hunter, 2005). Os murganhos *nude*, que apresentam uma marcada depleção dos linfócitos T e uma perturbação da função dos linfócitos T e B, foram também descritos como tendo redução da angiogénese (Takizawa et al., 1997); os murganhos SCID têm defeitos combinados do número e função tanto dos linfócitos B como dos linfócitos T. Adicionalmente, existem dados sobre diferenças significativas no processo angiogénico entre tumores autóctones e transplantados, o que pode reduzir o poder preditivo dos xenotransplantes para os tumores clínicos (Alani, Silverthorn, & Orosz, 2004; Sikder et al., 2003).

Os transplantes (singênicos ou xenogênicos) podem ser ortotópicos, ou seja, as células neoplásicas ou os fragmentos tumorais são colocados no local onde se esperaria que surgissem naturalmente no hospedeiro, ou podem ser subcutâneos (heterotópicos) (Figura 13) (National Cancer Institute, 2016).

A transplantação ortotópica refere-se à introdução de células neoplásicas no local anatômico ou tecido de onde estas derivaram originalmente. Este tipo de transplante permitiu desenvolver modelos tumorais que se aproximam mais dos tumores humanos, sobretudo na sua histologia, vascularização, expressão genética, responsividade à quimioterapia e biologia metastática (Bibby, 2004; Khanna et al., 2000; Loi et al., 2011). À medida que mais se sabe acerca da importância das interações entre o microambiente hospedeiro e o tumor, compreende-se porque é que os tumores ortotópicos são normalmente preferidos em vez dos convencionais modelos de implantação no flanco (s.c.). O transplante ortotópico de células neoplásicas pode ser realizado através da injeção direta de células neoplásicas ou por implantação cirúrgica de fragmentos intactos do tumor (Hoffman, 1999; Khanna et al., 2000).

Os modelos tumorais com base em transplantes têm, contudo, diversas limitações que impedem a reprodução do desenvolvimento natural e multifaseado da tumorigénese espontânea e autóctone (Eklund et al., 2013).

As células neoplásicas humanas que são usadas para fazer xenotransplantes são linhas celulares que têm sido propagadas em cultura como populações puras durante muitos anos, muitas vezes durante décadas. Um conjunto de 60 destas linhas celulares neoplásicas humanas foi estabelecido no *National Cancer Institute (NCI)* como reagentes padrão a serem usados nos Estados Unidos da América para avaliar a eficácia de potenciais agentes antitumorais. Muitas destas linhas celulares do painel “NCI-60” não são representativas dos neoplasmas encontrados rotineiramente na prática clínica oncológica, porque derivam de tumores humanos particularmente agressivos que originaram células que se revelaram especialmente adaptáveis à propagação *in vitro* (Weinberg, 2014c).

Apesar de terem uma aplicação clara no estudo de parâmetros do crescimento tumoral primário, estes modelos baseados em transplantes não recapitulam as subtilidades observadas nos tumores humanos que surgem em diversos órgãos simultaneamente ou faseadamente, mas também em termos de suscetibilidade condicionada por polimorfismos genéticos, características histológicas e progressão de lesões benignas pré-malignas para tumores de agressividade crescente. Além disso, os modelos tumorais transplantados, apesar de serem frequentemente usados como uma base para testar a atividade de vários fármacos antitumorais em ensaios pré-clínicos, não preveem necessariamente os benefícios limitados ou o fracasso que muitas vezes

se acaba por descobrir nos ensaios clínicos (Douglas Hanahan et al., 2007; Robert S. Kerbel, 2003; Sharpless & Depinho, 2006).

De fato, agentes anti-angiogénicos, como a endostatina e a angiostatina, que demonstraram uma eficácia significativa como agentes terapêuticos isolados ou em combinação com outros agentes terapêuticos, em modelos murinos com transplantes (Boehm, Folkman, Browder, & O'Reilly, 1997; Holmgren, O'Reilly, & Folkman, 1995; M S O'Reilly, Holmgren, Chen, & Folkman, 1996), não revelaram a mesma eficácia em ensaios clínicos com pacientes oncológicos terminais (Davis et al., 2004; Hansma et al., 2005; J. P. Thomas et al., 2003). Para ultrapassar as limitações dos modelos transplantados, foram desenvolvidos vários modelos com base em murganhos geneticamente modificados (Eklund et al., 2013).

2.3.4.2. Modelos murinos geneticamente modificados

Durante a década de 80 do século passado foi demonstrado que a presença de oncogenes únicos predisponha os murganhos transgénicos ao desenvolvimento de tumores. Por exemplo, a expressão de *Myc* no epitélio mamário predisponha os murganhos a desenvolver adenocarcinoma da mama (T. A. Stewart, Pattengale, & Leder, 1984), a expressão de *k-ras* ativado nas células acinares do pâncreas (Quaife, Pinkert, Ornitz, Palmiter, & Brinster, 1987) e a expressão do antígeno T do *Simian Virus* 40 (SV40) no epitélio cerebral (Brinster et al., 1984) ou nas células- β dos ilhéus de Langerhans (Douglas Hanahan, 1985) também conduzia à transformação maligna desses tipos celulares. Seguiram-se diversos ensaios desta natureza que, coletivamente, demonstraram que a expressão de oncogenes nas células da linha germinativa podia predispor os animais ao desenvolvimento de cancro (J. M. Adams & Cory, 1991; Sharpless & Depinho, 2006)

Esta descoberta, a par do desenvolvimento das técnicas de *gene targeting* e transgénese, permitem hoje realizar modificações do genoma murino que replicam os diferentes tipos de aberrações genéticas ou mutações, que a comunidade de investigação descobriu estarem associadas aos vários tipos de cancro humano. Hoje em dia, o genoma murino pode ser modificado com grande precisão, permitindo testar como, quando e onde, e que combinações de alterações genéticas específicas, estão envolvidas na iniciação e progressão do cancro (National Cancer Institute, 2016).

Os tumores que se desenvolvem nos modelos murinos geneticamente modificados (GEMMs) evoluem num contexto de um sistema imunitário intacto e permitem o estudo de um conjunto de interações, entre o estroma e as células neoplásicas, que afetam processos como a angiogénese e a degradação da MEC, necessários à progressão tumoral. Estes modelos podem ser projetados de modo a apresentarem uma elevada penetrância com períodos de latência mais

curtos e com esquemas de cruzamentos que simplificam o estabelecimento de populações predispostas ao desenvolvimento de tumores com um mínimo de genotipagens. Além disso, no seu desenho, podem ser incluídos alelos condicionais cuja ativação depende da administração de doses únicas de tamoxifeno ou de agentes indutores de interferão, permitindo ativar oncogenes, ou inativar genes supressores tumorais, especificamente em determinados tipos celulares. A resposta a vários tipos de terapêutica pode ser sistematicamente monitorizada de diversas formas, desde palpação, rastreios de marcadores serológicos tumorais, atividade de luciferase e tomografia computadorizada (CT) ou imagiologia por ressonância magnética (MRI). Estes modelos, que reproduzem de forma mais fidedigna o que acontece em diversos tipos de cancro humano, constituem hoje importantes plataformas para testar novas abordagens terapêuticas dirigidas não só a alterações genéticas específicas como também ao microambiente tumoral (Sharpless & Depinho, 2006).

Os GEEMs permitem ainda investigação de importantes determinantes do cancro, como a influência da heterogeneidade genética no fenótipo tumoral, que são difíceis ou impossíveis de avaliar recorrendo a cultura de tecidos *in vitro* ou sistemas de transplantação (Khanna & Hunter, 2005).

Os murganhos geneticamente modificados (GEM – *Genetically Engineered Mice*) podem ser classificados como transgénicos ou endógenos. Esta distinção não é meramente semântica, sendo altamente relevante uma vez que, em certas situações, determina o resultado experimental (Frese & Tuveson, 2007).

Os GEM transgénicos são murganhos mutantes que expressam oncogenes ou genes supressores tumorais (TSGs – *Tumour-Suppressor Genes*) dominantes-negativos de uma forma não-fisiológica devido à presença de um promotor ectópico e de elementos *enhancer*. As vantagens dos GEM transgénicos incluem a capacidade para controlar de forma reversível a expressão de genes-alvo com ligandos exógenos como a doxíciclina (Schönig, Schwenk, Rajewsky, & Bujard, 2002) ou interferão (Kühn et al., 1995). Uma das desvantagens é a dificuldade de controlar, com a precisão necessária a expressão dos oncogenes a um nível fisiológico (Frese & Tuveson, 2007).

Os GEM endógenos representam os murganhos mutantes que perdem a expressão de TSGs ou expressam TSGs dominantes-negativos ou oncogenes sob o controlo dos seus promotores nativos, através da utilização de tecnologia *knockout* ou *knockin*. Os GEM condicionais dependem da utilização de recombinases sítio-específicas, como a Cre, para controlar espácio-temporalmente a mutação do genoma murino. A utilização destes modelos condicionais deverá revelar-se bastante útil na compreensão de questões moleculares e terapêuticas bastante relevantes (Frese & Tuveson, 2007).

As primeiras publicações sobre modelos transgênicos de cancro surgiram em 1984 (Brinster et al., 1984). Um modelo de tumores do cérebro foi desenvolvido através da introdução de um oncogene viral, o antígeno-T do SV40, em oócitos murinos. Um outro modelo foi desenvolvido, introduzindo em oócitos fertilizados, um oncogene mutante de humano, o *c-Myc*, através do MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*), um vírus murino que infeta especificamente o tecido mamário murino; verificou-se que os murganhos obtidos acabavam por desenvolver tumores mamários que se assemelham aos tumores mamários humanos (T. A. Stewart et al., 1984). Estes primeiros modelos foram o ímpeto para o desenvolvimento de um grande número de modelos transgênicos de cancro, utilizando oncogenes que muitos laboratórios descobriram estar associados a vários tipos de cancro humano (National Cancer Institute, 2016).

Nos animais transgênicos, promotores com elevada especificidade do tipo celular em que estão ativos, podem ser utilizados para dirigir a expressão de oncogenes, fatores de crescimento, ou recetores, entre outros, numa grande diversidade de células-alvo. Consequentemente, a análise dos murganhos transgênicos que expressam oncogenes em diferentes tecidos revelou que, quer o tipo celular, quer o tipo de oncogene, influenciam o fenótipo tumoral (J. M. Adams & Cory, 1991; Cory & Adams, 1988; Chantale T. Guy & Cardoso, 2001; Douglas Hanahan, 1988).

O desenvolvimento de modelos animais transgênicos que desenvolvem de forma espontânea uma patologia semelhante à que é encontrada em humanos, permitiu à comunidade científica adquirir conhecimentos mais aprofundados sobre o papel e função de vários genes na progressão tumoral. Deste modo, os GEM transgênicos representam um dos melhores sistemas para estudar o papel de diversos genes na progressão tumoral e metastização (Chantale T. Guy & Cardoso, 2001).

Contudo, os GEMMs também têm limitações. Uma delas é o fato de alguns se basearem em mutações de um único gene, não mimetizando assim toda a complexidade genética e heterogeneidade verificada nos tumores humanos. Esta questão pode afetar a comparação de respostas terapêuticas nos modelos pré-clínicos com as dos ensaios clínicos (Eklund et al., 2013; Farago, Snyder, & Jacks, 2012; Mallika Singh, Murriel, & Johnson, 2012).

Outras limitações incluem a despesa, o tempo, restrições de propriedade intelectual (B. Weiss & Shannon, 2003) e diferenças inerentes à espécie que resultam em diferentes fenótipos nos murganhos e nos humanos (Jacks, 1996). Além disso, não existe um único modelo transgénico representativo de todas as formas de um único histiotipo tumoral, do mesmo modo que um tumor humano não representa outro tumor humano do mesmo histiotipo. Por outro lado, os transgenes dos GEMMs são dirigidos por promotores artificiais que podem afetar o tipo de celular afetado. Existem ainda questões relacionadas com o fundo genético de diferentes

estirpes de murganhos que podem também influenciar a expressão dos transgenes. Pela sua própria natureza, os GEMMs não incorporam a heterogeneidade inerente à iniciação, progressão e metastização tumoral (Stringer et al., 2005), além disso, raramente se encontra a doença disseminada nos GEMMs (Hann & Balmain, 2001; Van Dyke & Jacks, 2002).

Uma vez que a progressão multifaseada do cancro humano envolve insultos genéticos sucessivos em diversos *loci*, mais recentemente, os esforços têm sido no sentido de desenvolver GEEMs que apresentam combinações de mutações oncogénicas que podem ser ativadas e desativadas em momentos e tipos celulares específicos (Eklund et al., 2013; Farago et al., 2012; Mallika Singh et al., 2012).

2.3.4.3. Modelos autóctones

Os modelos tumorais autóctones incluem os tumores que surgem espontaneamente e os tumores induzidos por carcinogénicos químicos, físicos ou virais (James E. Talmadge, 2010).

Apesar da crescente sofisticação da manipulação genética do genoma do murganho, mutações espontâneas que ocorrem naturalmente ou que são quimicamente induzidas, continuam a constituir importantes modelos de doença humana. Murganhos mutantes espontâneos podem modelar mutações causadoras de doença em humanos e as alterações associadas, de forma mais fidedigna que mutações engenheiradas (The Jackson Laboratory, 2014).

A sequenciação de ADN de alto rendimento (HTS – *High Throughput Sequencing*) tornou possível o anteriormente inimaginável objetivo de identificar de forma rápida, económica e eficiente, mutações espontâneas. As tecnologias atuais permitem realizar HTS de grandes segmentos, exomas e até mesmo de genomas inteiros quer de ratinhos quer de humanos (The Jackson Laboratory, 2014).

As vantagens dos tumores autóctones incluem o crescimento ortotópico, histologia tumoral desprovida de alterações induzidas pela transplantação e metastização linfática e hematogénica (Berger, 1999). Apesar de todas as aspetos positivos, este tipo de modelo tumoral não tem sido muito utilizado. Estes tumores apresentam uma variabilidade inerente em termos de tempo para o desenvolvimento tumoral, mas também na frequência de iniciação tumoral e número de tumores. Por isso, muitas vezes a utilização deste tipo de modelo implica também a utilização de um grande número de animais (James E. Talmadge et al., 1986). Muitas vezes estes modelos requerem um período de tempo de meses a um ano para completar uma experiência, por oposição a apenas semanas nos casos dos modelos de transplantes (Berger, 1999; Schwartz, Birk, Raz, & Madar, 2004; James E. Talmadge et al., 1986). Como tal, os modelos autóctones são normalmente guardados para estudos de confirmação (Berger, 1999) apesar de na era “pós-

genoma” este tipo de modelo ter sido em parte substituído pelos GEMMs (James E. Talmadge, 2010).

2.3.5. Modelos de metastização

O papel crítico da metastização no prognóstico e terapêutica dos pacientes com cancro, conduziu à investigação do processo em modelos *in vitro* e *in vivo* (Brooks & Schumacher, 2001).

Os estudos com animais são dispendiosos, demoram muito tempo e são objeto de regulação rigorosa (Welch, 1997). Os ensaios *in vitro*, são superiores na eliminação de variáveis e na diminuição de variabilidade intra-experimental, permitindo o estudo detalhado de cada uma das capacidades das células neoplásicas necessárias para completar a cascata de invasão-metastização (Brooks & Schumacher, 2001). Contudo, os modelos *in vitro* não têm complexidade suficiente para estudar o processo metastático como um todo: a metastização não é equivalente a invasão, adesão, migração, taxa de proliferação ou suscetibilidade à morte mediada por células imunitárias. Assim, os estudos *in vivo* ainda são o “*gold standard*” para testar o comportamento maligno. Qualquer correlação estabelecida *in vitro*, tem de ser confirmada utilizando um estudo *in vivo* delineado de forma adequada (Welch, 1997).

Existe também uma apreciação crescente da importância do microambiente e da necessidade de testar novos fármacos no contexto celular apropriado (Rak et al., 1995; Zent, Ailenberg, & Silverman, 1998). Do mesmo modo, muitos fármacos têm um componente anti-angiogénico que pode aumentar significativamente a sua eficácia *in vivo* (Kohl et al., 1994). Tais propriedades não são detetáveis em ensaios *in vitro* (Eccles, 2001).

As culturas celulares em monocamada são normalmente irrealisticamente sensíveis a fármacos citotóxicos quando comparadas com metástases tumorais sólidas. Pelo contrário, alguns alvos terapêuticos importantes estão sobre-regulados nas metástases (Radinsky, 1995) – e de fato contribuem para o fenótipo invasivo e angiogénico (O-charoenrat et al., 2000; Petit et al., 1997) – pelo que, avaliar potenciais inibidores *in vitro* ou contra tumores primários implantados pode subestimar a sua eficácia contra as metástases (Eccles, 2001).

A natureza complexa do processo metastático dita assim a necessidade de sistemas experimentais que mimetizem de forma mais próxima os fatores endógenos envolvidos (McClatchey, 1999).

Os investigadores desenvolveram por isso modelos animais para analisar o fenótipo metastático das células neoplásicas e para avaliar a eficácia de agentes antitumorais (Salmon et al., 2012). Modelos bem escolhidos permitirão uma melhor compreensão das bases moleculares da metastização e, dessa forma, o desenvolvimento de terapias mais eficazes. Os desafios (a nível

celular e molecular) enfrentados por uma célula neoplásica que abandona o tumor primário e por fim se estabelece e prolifera num local secundário, são provavelmente muito semelhantes entre os murganhos e o homem. A tarefa dos investigadores passa assim por identificar os requisitos básicos e delinear experiências apropriadas para avaliar estes novos agentes. Estas experiências terão de ser necessariamente diferentes dependendo do alvo e do componente da cascata de metastização que está envolvido (Eccles, 2001).

Para compreender a metastização primeiro é importante reconhecer que este é um processo distinto do crescimento tumoral primário. Nem todas as células de um tumor primário têm a capacidade de metastizar (Welch, 1997).

Compreende-se assim que, se o objetivo é compreender as metástases, são necessários modelos concebidos propositadamente para este fim (Welch, 1997).

Na conceção de modelos para o estudo da metastização tumoral, é necessário cumprir dois critérios. O primeiro é aparentemente muito óbvio: utilizar células metastáticas (a “semente”). O segundo critério para estes ensaios é que as células neoplásicas têm de crescer num microambiente orgânico relevante (o “solo”). Será por isso redundante afirmar que o resultado de qualquer estudo sobre metástases depende tanto das células neoplásicas como das propriedades das células e do tecido hospedeiro (Welch, 1997).

Os modelos de metastização *in vivo* descritos incluem: o modelo de metastização no embrião de galinha, modelos de tumores transplantados tipicamente em roedores, GEMMs que metastizam e tipos de cancro que se desenvolvem naturalmente em animais de companhia, sobretudo cães (frequentemente referidos como modelos comparativos) (Brooks & Schumacher, 2001; Khanna & Hunter, 2005).

Um ensaio muito usado tira partido do acesso relativamente fácil ao embrião de galinha em desenvolvimento através da criação de uma janela na casca do ovo. A membrana corioalantóica (CAM – *ChorioAllantoic Membrane*) da galinha é uma membrana rica em vasos sanguíneos e facilmente acessível. Xenotransplantes de células neoplásicas podem ser realizados nesta membrana e a capacidade de intravasação e disseminação das células neoplásicas nos vasos sanguíneos vizinhos pode ser estudada num embrião vivo (Quigley & Armstrong, 1998) (McClatchey, 1999).

Um dos principais avanços no estudo da metastização foi o desenvolvimento de linhas celulares neoplásicas e de hospedeiros animais singénicos (Fidler, 1986; Neulat-Duga et al., 1984; Poste, 1982; Sharkey & Fogh, 1984). Particularmente, a seleção de sublinhas de melanoma murino B16 (Fidler, 1973) despoletou toda uma nova era na investigação da metastização (Welch, 1997).

Uma grande parte da compreensão fundamental do fenótipo metastático foi obtida utilizando modelos de transplantes singênicos e outros semelhantes (Welch, 1997). Nestes modelos podem realizar-se intervenções terapêuticas e os resultados podem ser avaliados para compreender o potencial dos tratamentos na disseminação das células metastáticas. Tendo em conta a importância da interação entre o tumor e o estroma hospedeiro no processo metastático, duas propriedades importantes são a existência de um sistema imunitário competente e o fato de o microambiente tumoral e o hospedeiro serem da mesma espécie e com o mesmo fundo genético (Khanna & Hunter, 2005; National Cancer Institute, 2016). Contudo, tal como vimos, esta homogeneidade genética pode também representar uma desvantagem (Gonzalez & Kimura, 2001; Khanna & Hunter, 2005; National Cancer Institute, 2016).

Os modelos de xenotransplantes humano-murganho definem a outra categoria principal de modelos tumorais transplantáveis usados no estudo da metastização (Khanna & Hunter, 2005). Contudo, nestes modelos, quando se desenvolvem metástases, estas nem sempre apresentam os padrões de distribuição que são observados no tumor humano (Fodstad & Kjønneksen, 1994; Hart, 1982; Nicolson, 1993, 1994; Nicolson et al., 1994; Sugarbaker, 1988; D. Weinstat-Saslow & Steeg, 1994). Além disso, estes modelos têm tipicamente uma taxa de metastização baixa e altamente variável em comparação com os modelos singênicos que desenvolvem metástases de uma forma mais previsível (Brooks & Schumacher, 2001; Khanna & Hunter, 2005; Salmon et al., 2012). Nestes modelos, não só o sistema imunitário está perturbado, como também existem citocinas específicas e outros mediadores moleculares que não “comunicam” entre espécies, o que pode justificar a menor incidência de metastização em muitos destes animais xenotransplantados, comparativamente aos que têm transplantes singênicos (Barnett & Eccles, 1984; Eccles, 1983). Também, com o crescente interesse em terapias anti-angiogénicas, apesar de muitos sistemas tumorais serem testados para a sua sensibilidade, existe a limitação adicional de a vasculatura ser sempre idêntica, isto é, é sempre a do hospedeiro murino (Eccles, 2001). Estão a decorrer estudos para “humanizar” os hospedeiros murinos de modo a ultrapassar alguns dos desafios dos modelos e técnicas de xenotransplantação (National Cancer Institute, 2016)

A utilização de modelos de transplantação, sejam eles singênicos ou xenogénicos, podem incluir uma de duas (ou ambas) abordagens experimentais para modelar o processo metastático: os ensaios de metastização experimental e os ensaios de metastização espontânea. Estes ensaios diferem essencialmente na forma como as células neoplásicas são introduzidas/implantadas nos animais recetores (Khanna & Hunter, 2005).

A maior parte dos modelos de metastização que recorrem a tumores transplantáveis tem usado como estratégia a metastização experimental. Esta técnica implica a injeção das células

neoplásicas diretamente na circulação sistêmica. Dependendo do local de injeção e do tipo de célula neoplásica, podem desenvolver-se, ou não, metástases distantes. O local de administração é o principal fator que define a localização anatômica das metástases. Nos modelos de metastização experimental, o local mais comumente utilizado para injeção das células neoplásicas é a veia lateral da cauda. A administração neste local resulta tipicamente no aparecimento de metástases pulmonares. A injeção na veia porta ou intraesplênica é o local mais frequentemente utilizado para obter metástases hepáticas. A administração intracardíaca de células neoplásicas pode resultar no aparecimento em diversos locais do corpo, incluindo o osso (Khanna & Hunter, 2005).

A influência do local de injeção no órgão-alvo final é explicada, em parte, pela primeira cama capilar que as células neoplásicas encontram após entrarem na circulação. Contudo, neste modelo também se verifica o conceito “semente e solo”: após a injeção intracardíaca (ventrículo esquerdo) das células neoplásicas, é possível encontrar êmbolos ou células neoplásicas solitárias na maior parte dos órgãos do corpo; contudo, no caso de linhas celulares neoplásicas da mama ou da próstata, são encontradas metástases apenas nos ossos (Holleran, Miller, Edgehouse, Pretlow, & Culp, 2002). Mais evidências decorrem de linhas celulares que metastizam para locais que não o pulmão após serem administradas na veia lateral da cauda, apesar de os pulmões terem a primeira, e também maior, cama capilar que as células encontram (Bogenmann, 1996; Fidler & Nicolson, 1976; Iwakawa, Ando, Ohkawa, Koike, & Chen, 1994; Khanna & Hunter, 2005; Nanni et al., 1989).

Uma etapa importante no estabelecimento de modelos de metastização experimental foi o desenvolvimento de variantes de linhas celulares neoplásicas metastáticas, clonalmente relacionadas, que apenas diferem no seu potencial metastático. Com base na hipótese de heterogeneidade tumoral, Fidler e os seus colegas desenvolveram linhas celulares, a partir de uma linha celular parental, que eram caracterizadas por apresentarem um potencial metastático progressivamente maior através da recolha sucessiva de metástases do pulmão e re-injeção na veia lateral da cauda (Fidler & Kripke, 1977; Fidler & Nicolson, 1977). Destes modelos, o melhor caracterizado é o modelo de melanoma murino B16. A linha celular parental B16-F1 tem capacidade para formar metástases numa taxa de aproximadamente $1,3 \times 10^{-5}$ por geração, enquanto a linha celular descendente B16-F10, resultante da repetição sucessiva do processo de seleção das células presentes nos focos pulmonares e injeção na veia da cauda, tem uma taxa efetiva de metastização de cerca 5×10^{-5} por geração (Karparkin & Pearlstein, 1981; Poste, Doll, Hart, & Fidler, 1980).

Os modelos de metastização experimental apresentam diversas vantagens. O período de tempo para a maturidade do modelo é normalmente bastante curto, a biologia da metastização é

reprodutível e consistente, e o utilizador tem controlo sobre o número e tipo de células que são introduzidas na circulação. Este controlo do “*input*” foi usado por Chambers e pelos colegas para definir características importantes das etapas envolvidas na cascata de metastização e nos processos de extravasação celular e sobrevivência nos locais metastáticos distantes (A. F. Chambers et al., 2001; Khanna & Hunter, 2005).

Os dados obtidos nos modelos murinos de metastização experimental estão de acordo com evidências clínicas. Populações celulares enriquecidas por células altamente metastáticas, sofrem um extenso desgaste após infiltração dos órgãos distantes (Ann F. Chambers et al., 2002). Por exemplo, células neoplásicas introduzidas por via endovenosa podem chegar aos pulmões, mas uma grande parte morre nos dois dias seguintes (C. W. Wong et al., 2001), tal como as células neoplásicas introduzidas por via arterial e que se alojam no cérebro, fígado ou medula óssea (Minn et al., 2005). A grande maioria das células de melanoma que são injetadas na veia porta, não consegue formar micrometástases no fígado, e apenas 0,02% acaba por formar macrometástases (Cameron et al., 2000; Luzzi et al., 1998). Do mesmo modo, a maioria das células neoplásicas que infiltra o cérebro, acaba por morrer (Heyn et al., 2006; Kienast et al., 2010; Valiente et al., 2014). Neste tipo de modelo, esta ineficiência não pode ser atribuída a uma escassez de células neoplásicas estaminais com potencial iniciador metastático: a maioria das células neoplásicas estaminais de carcinomas mamários que chega ao pulmão, acaba por sofrer apoptose (Malanchi et al., 2012) e células neoplásicas estaminais de carcinomas colorrectais são rapidamente eliminadas após infiltrarem o parênquima hepático (Calon et al., 2012). Observações como estas, em modelos murinos e na clínica, implicam que os fatores que influenciam a sobrevivência e a capacidade iniciadora tumoral das células tumorais disseminadas são determinantes importantes da metastização (Massagué & Obenauf, 2016).

Contudo, o fato de as primeiras etapas da cascata de metastização não estarem incluídas nos modelos de metastização experimental é uma potencial desvantagem. A introdução de células diretamente no sistema circulatório não permite que estas passem por diversos eventos importantes que se pensam ser pilares fundamentais da disseminação metastática, incluindo a saída do tumor primário, invasão do estroma adjacente e a subsequente intravasação no sistema circulatório. Acredita-se que muitas células neoplásicas metastizam como êmbolos constituídos por células neoplásicas que escapam do tumor primário e se associam a plaquetas e outras células do hospedeiro antes de serem detidas em locais distantes. Pelo contrário, após a injeção na veia da cauda, as células neoplásicas circulam frequentemente em grandes números como células solitárias ou como pequenos agregados de plaquetas. Estas células solitárias podem não ser detidas ou interagir com os tecidos alvo da mesma forma que as células neoplásicas que metastizam de forma espontânea (como êmbolos). Além disso, o processo de metastização

espontânea, a partir de um tumor primário, pode estar associado a eventos de seleção que produzem um perfil distinto de metastização bem-sucedida. Por isso, a metastização experimental tem sido frequentemente descrita como o desenvolvimento de múltiplos tumores primários no pulmão (Khanna & Hunter, 2005).

Ainda em relação à relevância dos modelos de metastização experimental, existe o fato de muitos destes modelos terem sido selecionados pela sua propensão metastática. É importante considerar também propriedades da biologia metastática cuja seleção é impedida por este processo de modelação. Estas propriedades críticas incluem a dormência e a ineficiência metastática. Além disso, o curto espaço de tempo necessário para o desenvolvimento de metástases nestes modelos, frequentemente exclui a sua utilização para definir agentes terapêuticos contra cânceros estabelecidos e já metastizados (Khanna & Hunter, 2005).

Os transplantes tumorais (singénicos ou xenogénicos, ortotópicos ou subcutâneos) podem metastizar de forma espontânea (Khanna & Hunter, 2005).

A aplicação da hipótese “semente e solo” nos modelos de metastização, resultou na utilização da abordagem ortotópica no transplante de células neoplásicas ou de fragmentos tumorais em murganhos (An, Wang, Geller, Moossa, & Hoffman, 1998; Bibby, 2004; Fidler, Naito, & Pathak, 1990; Hoffman, 1999; Killion, Radinsky, & Fidler, 1998; Nagamachi et al., 1998; Tan, Holyoke, & Goldrosen, 1977). Para muitos modelos ortotópicos, a utilização de implantação cirúrgica de fragmentos melhora a reprodutibilidade e o resultado metastático (Hoffman, 1999; Khanna et al., 2000).

O fato de os tumores ortotópicos estarem mais frequentemente associados a metastização do que os tumores subcutâneos, salienta o valor de providenciar interações entre o hospedeiro e o tumor mais relevantes. Do mesmo modo, o fato de surgirem metástases espontâneas a partir de tumores primários transplantados, oferece uma oportunidade para estudar o processo metastático e muitos aspetos da cascata metastática que são normalmente omitidos quando se usam modelos de metastização experimental (Hoffman, 1999; Khanna et al., 2000).

Para aqueles modelos ortotópicos em que o crescimento do tumor primário é rápido, a utilização de cirurgia é frequentemente necessária para controlar a morbilidade associada ao volume tumoral primário excessivo (Bibby, 2004; Khanna et al., 2000). Nalguns casos, pode ser argumentado que a remoção do tumor primário contribui tanto para aumentar como para suprimir a metastização, dependendo do modelo usado (Khanna & Hunter, 2005).

A metastização espontânea a partir de implantes heterotópicos ou ortotópicos, apesar de proporcionar um contexto mais natural ao processo (ao contrário da metastização experimental), sofre igualmente de potenciais problemas. Os modelos de implantação não recapitulam necessariamente todas as interações e os componentes do microambiente que

podem desempenhar um importante papel na disseminação tumoral. Além disso, a disrupção mecânica do tecido alvo durante o processo de implantação, pode permitir a evasão de células neoplásicas para o sistema circulatório no momento da implantação, atingindo desse modo os locais distantes logo no início do ensaio e não como consequência do crescimento do tumor primário, tal como se pretendia. Os trabalhos de Folkman e colegas demonstraram que os tumores transplantados podem suprimir o crescimento de tumores secundários por intermédio de fatores solúveis (M. O'Reilly et al., 1994). Assim, é possível que a implantação heterotópica (s.c.) ou ortotópica, através da supressão das lesões secundárias, nem sempre possa permitir a análise das fases mais precoces do processo metastático. Além disso, as células usadas nos ensaios de metastização experimental ou espontânea passaram por um processo de adaptação resultante do crescimento em matrizes planas, a duas dimensões, em vez de plataformas tridimensionais normais, num meio de cultura artificial ou estranho. As adaptações que permitem a proliferação perpétua em cultura, podem ter um impacto significativo nas vias e mecanismos através dos quais as metástases que surgem espontaneamente subsistem (Khanna & Hunter, 2005).

Os méritos relativos da metastização experimental e da metastização espontânea têm sido alvo de muita discussão. Não existe qualquer dúvida de que os dois não são equivalentes, mas o primeiro pode ser particularmente útil quando é necessária uma quantificação mais precisa (Eccles, 2001). Em muitos ensaios, os modelos de metastização espontânea a partir de transplantes, utilizam a almofada plantar (*footpad*) ou o baço como local de implantação e, apesar de tais técnicas em muitos casos conduzirem a uma elevada incidência de metástases nos linfonodos poplíteos e no fígado, respetivamente, as células neoplásicas são quase certamente forçadas diretamente na vasculatura por pressões mecânicas. Estas técnicas têm sido, por isso, mais utilizadas para testar intervenções terapêuticas do que para estudar os mecanismos básicos da metastização (Eccles, 2001).

Para complementar os modelos de metastização experimental e espontânea, os investigadores precisam de ter disponíveis tumores que se desenvolvam de modo autóctone e que sejam capazes de completar todo o processo metastático (Khanna & Hunter, 2005).

Infelizmente, nos murganhos, ao contrário dos humanos, a maioria dos tumores que surgem naturalmente de modo espontâneo, pelo menos nos murganhos, não metastiza ou metastizam com um período de latência muito longo, ou são caracterizados por originarem apenas metástases intravasculares, excluindo assim uma análise fácil e eficiente (Khanna & Hunter, 2005) (McClatchey, 1999).

A investigação sobre a metastização tem sido assim prejudicada pela complexidade inerente ao processo e por uma falta de modelos experimentais adequados (Massagué & Obenauf, 2016).

Felizmente, um grande número de GEMMs que desenvolvem metástases de forma espontânea (Khanna & Hunter, 2005), foram já desenvolvidos. Além disso, o desenvolvimento de modelos de metastização derivados dos pacientes, de melhores tecnologias de imagiologia, da sequenciação genômica avançada, incluindo a capacidade para analisar células únicas, juntamente com o melhor acesso a amostras de tecido clinicamente significativas, trouxe novas perspectivas à nossa compreensão dos mecanismos moleculares que permitem às células tumorais circulantes invadir órgãos distantes e instalar-se em nichos que fornecem o suporte adequado (Massagué & Obenauf, 2016).

Uma vez que a heterogeneidade genética tem um profundo impacto na expressão de mutações oncogénicas, a eficiência metastática é também significativamente influenciada pelo fundo genético. Foi através da utilização de GEMMs e de diferentes combinações de estirpes, que se demonstrou que o polimorfismo desempenha um papel central na metastização (Lifsted et al., 1998).

Contudo, a metastização é também um evento raro na maioria dos modelos murinos transgénicos de cancro. Menos de 30% destes modelos demonstraram uma penetrância de 100% do fenótipo metastático (Gallahan et al., 1996; Jeffrey R. Gingrich et al., 1996; C T Guy et al., 1992; Jhappan et al., 1992; Penna et al., 1998; Perez-stable et al., 1997; Z. T. Zhang et al., 1999). Nestes modelos de cancro, a escassez de doença metastática possivelmente deve-se ao fato de a expressão dos oncogenes promover seletivamente a etapa de proliferação tumoral. Os tumores de murganhos transgénicos que expressam oncogenes, frequentemente progridem de uma hiperplasia benigna para o aparecimento de tumores vascularizados, enquanto a invasão e metastização surgem como eventos muito tardios. O momento em que a invasividade é ativada pode por isso influenciar de modo dramático as características subsequentes do cancro (Chantale T. Guy & Cardoso, 2001).

Apesar de infrequentes, os tumores transgénicos sempre metastizam com maior frequência do que tumores induzidos quimicamente ou que surgem de modo natural (espontâneo) (Khanna & Hunter, 2005).

Uma das desvantagens mais significativa destes sistemas é a despesa: na maioria dos modelos transgénicos, o período de latência (tempo para que surjam macrometástases) é medido em meses. Além disso, a penetrância relativa de doença metastática é frequentemente mais baixa do que a incidência de doença tumoral. Por exemplo, num modelo transgénico do adenocarcinoma da próstata, está descrito o desenvolvimento de metástases no pulmão, fígado e osso em 66 a 88% dos animais, mas com um período de latência de 6 a 9 meses (Masumori et al., 2001). Como resultado, são frequentemente necessários grandes números de animais que têm de ser mantidos por longos períodos de tempo, de modo a originar uma população

suficientemente grande que forneça dados que sustentem uma análise significativa. Além disso, devido à variabilidade na disseminação tumoral e penetrância da doença metastática é difícil, se não mesmo impossível, por vezes, fazer um correto estadiamento dos animais ou detetar a presença de doença metastática antes da morte. Apesar de as tecnologias de imagem recentemente desenvolvidas permitirem ultrapassar algumas destas limitações, são também bastante onerosas (Khanna & Hunter, 2005).

Diversas novas estratégias de imagiologia que foram desenvolvidas e adaptadas à utilização em murganhos incluem a bioluminescência, a imagem por ressonância magnética e o PET (*Positron Enhanced Tomography Scan*) (Diehn et al., 2002; Metz et al., 2003; Pomper, 2002; M. Yang et al., 2000). Os estudos imagiológicos das metástases têm incluído a utilização de técnicas de imagem que recorrem à bioluminescência e fluorescência para avaliar o destino das células metastáticas no corpo dos murganhos. As células neoplásicas podem ser transfetadas para expressar alvos específicos (por exemplo, GFP – *Green Fluorescent Protein*, ou luciferase) que posteriormente são detetados por estas técnicas de imagiologia, ou podem ser marcadas imediatamente antes da sua introdução nos murganhos (por exemplo, *quantum dots*, ou 5-clorometilfluoresceína diacetato (CMFDA)) (Ballou, Lagerholm, Ernst, Bruchez, & Waggoner, 2004; Jenkins et al., 2003; Khanna et al., 2004). Além disso, existem cada vez mais GEMMs que integram genes para os alvos específicos referidos (Khanna & Hunter, 2005).

As semelhanças anatómicas e fisiológicas que existem entre os cães e os humanos têm sido a base para a sua utilização na investigação biomédica nos últimos 70 anos (Hahn, Bravo, Adams, & Frazier, 1994; Khanna & Vail, 2003; Vail & MacEwen, 2000). Na população de animais de companhia, o cancro é uma doença espontânea que surge naturalmente. Em muitos casos, estes cancros partilham a biologia e o comportamento tumoral com os cancros humanos, incluindo a propensão metastática. Os animais de companhia representam assim um grupo subutilizado de modelos de cancro – os modelos comparativos de metastização (Khanna & Hunter, 2005).

Muitos fatores contribuem para o valor destes cancros espontâneos como modelos relevantes para o cancro humano e metastização tumoral. Estes animais partilham muitos dos mesmos fatores de risco ambientais, permitindo a sua utilização com sentinelas para o desenvolvimento da patologia oncológica (De Nardo, 1997; Glickman, Domanski, Maguire, Dubielzig, & Churg, 1983). A forte semelhança genética entre cães e humanos, evidenciada pelo recente esboço do projeto do genoma canino, permitiu a utilização de cães com tumores espontâneos na identificação de genes associados à tumorigénese (Lingaas et al., 2003; Pennisi, 2002).

Enquanto a maior parte dos modelos murinos de metastização são caracterizados por uma rápida progressão da doença metastática, a “janela investigacional” mais alargada

providenciada pelos modelos caninos de cancro torna-os particularmente importantes na definição de agentes ativos contra as metástases (Khanna & Hunter, 2005).

Tem sido afirmado que o tratamento de um tumor primário é relativamente fácil; contudo as metástases são frequentemente intratáveis sendo por isso a principal causa da morte associada ao cancro (McClatchey, 1999). A seleção de um modelo de metastização *in vivo* deverá assim ser adequada à natureza da questão em causa e realizada com um conhecimento completo das potencialidades e também das limitações de cada tipo de modelo (Khanna & Hunter, 2005). O desenvolvimento de melhores modelos de metástases que se desenvolvem de forma endógena nos murganhos, seguramente irá facilitar o desenvolvimento e testagem de abordagens terapêuticas mais eficazes (McClatchey, 1999).

Estes modelos, em conjunto com os modelos *in vitro* e com a manipulação de células neoplásicas, permitiram e continuarão a permitir explorar as questões críticas que ainda existem, incluindo a verdadeira natureza da dormência metastática, o papel e a identidade das pistas do microambiente tumoral e o desenvolvimento de fármacos que permitam prevenir ou tratar a doença metastática (Khanna & Hunter, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

3.1.1. Avaliação da eficácia da combinação Dll4Fc-doxorrubicina no tratamento do adenocarcinoma prostático – trabalho experimental I

Para estudar os efeitos da redução da sinalização Dll4/Notch no crescimento tumoral prostático dos murganhos TRAMP, foram realizadas intervenções terapêuticas em dois momentos da progressão tumoral. Nestes ensaios testamos a eficácia de sDll4Fc administrado por via sistêmica isoladamente ou em combinação com doxorrubicina.

Realizamos um ensaio de intervenção precoce, iniciado quando os animais alcançavam 12 semanas de idade. Nesta altura já existe neoplasia intraepitelial prostática (PIN – *Prostatic Intraepithelial Neoplasia*) de grau moderado a elevado e, nalguns animais, já se encontram adenocarcinomas pequenos bem diferenciados. Para este ensaio foram constituídos 2 grupos experimentais, com 5 murganhos TRAMP irmãos cada. Durante as 6 semanas de duração do ensaio, a cada grupo foi administrado por via intraperitoneal, 3 vezes por semana: sDll4Fc (20 mg/kg/dia) ou veículo (200 µL PBS – *Phosphate Buffer Saline*). Os animais foram sacrificados às 18 semanas de idade.

O ensaio de intervenção tardia, foi iniciado às 18 semanas de idade, quando já existem adenocarcinomas bem diferenciados. Para este ensaio foram constituídos 4 grupos experimentais, com 5 murganhos TRAMP irmãos cada. Durante as 6 semanas de duração do ensaio, a cada grupo foi administrado por via intraperitoneal, 3 vezes por semana: sDll4Fc (20 mg/kg/dia), doxorrubicina (2 mg/kg/dia), sDll4Fc (20 mg/kg/dia) e doxorrubicina (2 mg/kg/dia) ou veículo (200 µL PBS). Os animais foram sacrificados às 24 semanas de idade.

Ambos os ensaios foram realizados em duplicado.

Como a terapia com Dll4Fc se revelou mais eficaz quando iniciada às 18 semanas de idade, decidimos testar a combinação das terapias apenas no ensaio de intervenção tardia.

3.1.2. Estabelecimento de um modelo murino de metastização para o estudo da função endotelial do ligando Dll4 no processo metastático – trabalho experimental II

De modo a avaliar o papel especificamente endotelial do ligando Dll4 nas diversas etapas da cascata de invasão-metastização, tentamos estabelecer um modelo de metastização espontânea. Para isso, numa fase inicial, a linha de melanoma murino B16-F10 foi implantada subcutaneamente e intradermicamente na região do flanco de murganhos C57BL/6 *WT* (*Wild-Type*), de modo a obtermos um crescimento tumoral primário que, após remoção cirúrgica, nos permitisse obter macrometástases pulmonares. Esta parte do trabalho experimental teve como principal objetivo perceber se, nas nossas condições laboratoriais, conseguíamos um fenótipo

metastático espontâneo pulmonar com a linha celular de melanoma murino B16-10, para posteriormente realizar este mesmo procedimento em murganhos $Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre-ER^{T2}$.

Posteriormente, esta mesma linha celular foi também inoculada por via endovenosa, na veia lateral da cauda de murganhos C57BL/6 *WT* de modo a obtermos metástases pulmonares experimentais. Como este modelo foi o que nos permitiu obter resultados mais reprodutíveis, aplicámos a mesma metodologia em murganhos transgênicos $Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre-ER^{T2}$.

Foram realizados 7 ensaios de implantação subcutânea, com o mesmo inóculo celular (1×10^5 células B16-F10), mas diferentes tempos (10 a 22 dias) de desenvolvimento tumoral primário até realização de cirurgia e diferentes tempos (14 a 30 dias) desde a cirurgia até ao sacrifício dos animais por deslocamento cervical para recolha dos pulmões e linfonodos. Nestes ensaios utilizaram-se no total 31 murganhos macho C57BL/6 *WT*.

Foram realizados dois ensaios de implantação intradérmica (ortotópica). Num dos ensaios, em cada animal foram implantadas 3×10^4 células B16-F10 num volume de 50 μ L (isto é, de uma suspensão celular com 6×10^5 /mL); num outro ensaio foram implantadas 5×10^4 células B16-F10 num volume igual (isto é, de uma suspensão celular mais concentrada, com 1×10^6 /mL). A remoção cirúrgica dos tumores primários foi realizada 11 e 15 dias depois da implantação e os animais foram sacrificados 18 dias após a cirurgia. Nestes ensaios utilizaram-se no total seis murganhos macho C57BL/6.

O modelo de metastização experimental foi também inicialmente testado em murganhos C57BL/6 *WT*. Uma vez que está descrita uma influência do género neste modelo de metastização (Welch, 1997), realizámos um ensaio em fêmeas ($n = 5$) e um ensaio em machos ($n = 6$). Este ensaio foi repetido mais uma vez, para cada género, com o mesmo número de animais. Tendo obtido resultados reprodutíveis nestes dois ensaios em animais *WT*, realizámos então dois ensaios em murganhos $Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre-ER^{T2}$, um em que usámos 10 animais e outro em que usámos 12; em cada um deles usámos um número igual de animais $Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre^+-ER^{T2}$ (designados adiante como “Cre⁺”) e $Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre^-ER^{T2}$ (designados adiante como “Cre⁻”). Todos os animais foram induzidos com tamoxifeno, pelo que, os animais Cre⁻ serviram como controlo da deleção de um dos alelos do gene *Dll4* especificamente no endotélio. Todos os murganhos foram inoculados com 2×10^5 células B16-F10 num volume de 200 μ L de PBS. Foi preparada uma seringa para cada murganho. Estes murganhos foram sacrificados 18 dias após a inoculação endovenosa das células B16-F10.

3.1.3. Produção de uma nova linha de murganhos com perda-de-função condicional e induzível da Tetraspanin18 – trabalho experimental III

Para compreender a função da Tspan18 na angiogénese dos mamíferos e estudar se esta proteína tem potencial para se tornar num novo alvo da terapia oncológica anti-angiogénica, produzimos uma nova linha de murganhos, a Tspan18^{lox/lox} (ou Tspan *floxed*) por *gene targeting*. Para tal, eletroporámos o vetor Tspan18cKO (Tetraspanin18 *conditional knockout*) em células estaminais embrionárias R1. Os clones recombinantes homólogos foram agregados com embriões na fase de mórula e posteriormente transferidos para fêmeas pseudogestantes. As quimeras resultantes foram depois testadas para transmissão da mutação à descendência. Os descendentes F1 Tspan18^{lox/wt} foram cruzados entre si e com murganhos das linhas transgénicas *VE-cadherin-Cre-ERT²* e *CAGG-Cre-ERTTM* de modo a obter as linhas Tspan18^{lox/wt}-*VE-cadherin-Cre-ERT²* e Tspan18^{lox/wt}-*CAGG-Cre-ERTTM* que, por administração de tamoxifeno, nos permitiriam deletar a Tspan18 especificamente no endotélio ou ubiquamente, respetivamente, e desse modo estudar o fenótipo resultante da perda da sua função.

3.2. Murganhos

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno bem ventiladas e com o fundo revestido por uma cama de carolo-de-milho. Estas gaiolas encontravam-se em salas com um ciclo 12h luz/12h escuro, temperatura entre 22-25°C e humidade relativa de 65-70%. A alimentação (dieta padrão de laboratório, MucedolaTM 4RF24GLP ou NFM14, *pellet* 12 mm, alimento completo para manutenção de ratos e murganhos) e a água de bebida estiveram disponíveis *ad libitum*.

No presente trabalho experimental, todos os procedimentos que envolveram a utilização de animais foram aprovados pelo Comité de ética e bem-estar animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

A criação, manutenção das colónias e monitorização dos murganhos em experiência foi regularmente feita, de acordo com as exigências da FELASA.

3.2.1. TRAMP

O modelo transgénico de adenocarcinoma prostático mais usado é o TRAMP – *TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate*.

Este modelo mimetiza muito bem as etapas da progressão do adenocarcinoma da próstata humano e foi já validado por diversos autores (Jeffrey R. Gingrich et al., 1996; S. Gupta et al., 2000; W. J. Huss, Hanrahan, Barrios, Simons, & Greenberg, 2001; Wendy J. Huss, Barrios, Foster, & Greenberg, 2003; Kaplan-Lefko et al., 2003; Maddison, Huss, Barrios, & Greenberg,

2004; Uzgare, Kaplan, & Greenberg, 2003; Wechter et al., 2000). Desenvolve adenocarcinoma da próstata autóctone e progressivo com penetrância completa. A progressão deste tumor sólido é dependente de angiogénese e as características da vasculatura nas diferentes etapas histopatológicas podem ser estudadas sistematicamente (Greenberg et al., 1995; W. J. Huss et al., 2001)

Neste modelo, o promotor mínimo do gene *pro-basin* de rato (rPB), regulado por androgénios e expresso especificamente na próstata, ativa os genes da região precoce do que codificam antigénios tumorais que funcionam como oncoproteínas. A expressão destas oncoproteínas inicia-se às 4 semanas sendo máxima às 12 semanas de idade e a interação da sua forma ativa com os produtos de genes supressores tumorais, como *Rb*, *p53* e *Bub1* (envolvido no controlo da mitose), anula a sua função. A inativação de *Rb*, *P53* e *Bub1* desencadeia instabilidade genómica, inibição da reparação do ADN, sinalização aberrante e perturbação dos pontos de controlo do ciclo celular as quais são responsáveis pelo conjunto de alterações patológicas características do desenvolvimento tumoral (Greenberg et al., 1995).

O primeiro tipo de lesão histopatológica característica surge às 8 semanas: neoplasia intraepitelial prostática (PIN) que progride para adenocarcinoma bem diferenciado (WD – *Well Differentiated*) às 12 semanas e posteriormente para moderadamente diferenciado até uma fase pouco diferenciada (PD – *Poorly Differentiated*) com completa desorganização da glândula por volta das 24 semanas de idade (Kaplan-Lefko et al., 2003).

É importante notar que estes tumores surgem de forma espontânea (autóctone) e progridem pelas diferentes fases de uma forma espaço-temporal bem definida oferecendo assim janelas de oportunidade para desenhar ensaios de prevenção, estabilização ou regressão tumoral.

Outra razão que nos levou a escolher este modelo é o fato de estar descrito que às 12 semanas de idade se inicia a metastização hematogena e linfática, com particular incidência nos linfonodos peri-aórticos e pulmões, e que às 24-30 semanas de idade 100% dos animais apresenta metástases (Jeffrey R. Gingrich et al., 1996; Greenberg et al., 1995).

Por ter sido produzido num fundo genético *inbred*, o modelo TRAMP é o sistema ideal para estudos imunobiológicos que permitam compreender e caracterizar o papel do sistema imunitário na história natural do cancro da próstata e tornando-o uma plataforma ideal para investigar estratégias terapêuticas imunomoduladoras.

Os murganhos heterozigóticos TRAMP, com fundo genético C57BL/6, foram oferecidos pelo Dr. N. M. Greenberg (Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA).

3.2.2. C57BL/6

Os murganhos com fundo genético C57BL/6 foram adquiridos ao Jackson Laboratory em 2008 e posteriormente mantidos em cruzamentos consanguíneos no biotério da faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

Estes murganhos foram usados para recolha de próstatas controlo (*WT*) e também no estabelecimento de um modelo de metastização.

3.2.3. CD-1 e NMRI

A estirpe CD-1[®] (ICR) é uma estirpe *outbred* (ou não-consanguínea) albina. Está descrita como sendo de temperamento dócil, com excelentes características reprodutivas e maternais tendo em média 11 a 12 animais por ninhada.

A estirpe NMRI (*Naval Medical Research Institute*) é também uma estirpe *outbred* albina. Está descrita como sendo uma estirpe de crescimento rápido; os machos podem tornar-se agressivos a partir das 8 semanas de idade e as fêmeas têm uma elevada taxa reprodutiva com 8 a 9 animais por ninhada.

Murganhos fêmea destas duas estirpes foram usadas como dadoras de embriões e também como recetoras de blastocistos resultantes da agregação com as células estaminais embrionárias recombinantes homólogas.

Entre as fêmeas da estirpe CD-1 foram utilizados dois grupos distintos: um que resultou de cruzamentos entre animais já existentes no laboratório de acolhimento há cerca de dez anos (doravante designadas por CD-1 antigas) e outro que foi adquirido ao repositório Harlan em 2013 (doravante designadas por CD-1 novas). Os animais (machos e fêmeas) NMRI foram adquiridos ao biotério da Fundação Champalimaud em 2012.

Um grupo de machos da estirpe CD-1 foi vasectomizado para obter fêmeas CD-1 ou NMRI pseudogestantes. Nos cruzamentos para avaliar a capacidade de as quimeras transmitirem a mutação à descendência foram usados apenas animais da estirpe CD-1.

3.2.4. *VE-cadherin-Cre-ER^{T2}* e *CAGG-Cre-ERTM*

A linha de murganhos transgénicos *VE-cadherin-Cre-ER^{T2}* foi gentilmente cedida pelo Doutor Ralf Adams (Max-Planck-Institute for Molecular Biomedicine, Alemanha). A linha de murganhos transgénicos *CAGG-Cre-ERTM* foi adquirida ao Jackson Laboratory em 2012. Ambas as linhas foram mantidas em fundo genético C57BL/6 no laboratório de acolhimento. A administração de tamoxifeno aos animais resultantes do cruzamento destas linhas transgénicas com uma linha de murganhos *floxed*, resulta na ativação da recombinase Cre e

consequente deleção da sequência genética flanqueada por locais *loxP* (*floxed*) nos tipos celulares/ tecidos em que o promotor que dirige a expressão da Cre se encontra ativo.

Na linha transgênica *VE-cadherin-Cre-ER^{T2}* (Monvoisin et al., 2006), a expressão da recombinase Cre está sob a regulação do promotor do gene da VE-caderina (Alva et al., 2006; Gory et al., 1999; H. H et al., 2005; Prandini et al., 2005), uma molécula envolvida na adesão intercelular especificamente no endotélio vascular adulto/quiescente em condições fisiológicas e patológicas (Dejana, 1996; Lambeng et al., 2005; Lampugnani et al., 1995).

Na linha transgênica *CAGG-Cre-ERTM* a expressão da recombinase Cre é dirigida pelo promotor quimérico resultante do *enhancer* imediato-precoce de citomegalovirus e do promotor da β -actina de galinha (CAGG). Foi já demonstrado que este promotor tem a capacidade para dirigir a expressão ubíqua de diversos genes em murganhos transgênicos (Lobe et al., 1999; Niwa, Yamamura, & Miyazaki, 1991; Pratt, Sharp, Nichols, Price, & Mason, 2000). Nesta linha de murganhos os animais homozigóticos não são viáveis, pelo que são mantidos em heterozigotia em fundo genético C57BL/6.

3.2.5. *Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre-ER^{T2}*

Os murganhos transgênicos *Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre-ER^{T2}* em fundo genético C57BL/6 foram produzidos no laboratório de acolhimento e utilizados em trabalhos já publicados (Djokovic et al., 2010; Trindade et al., 2012).

Estes murganhos foram obtidos por cruzamento da linha transgênica *Dll4^{lox/lox}* (produzida no laboratório de acolhimento em colaboração com o laboratório do Doutor Freddy Radtke) (Koch et al., 2008) com a linha transgênica *VE-cadherin-Cre-ER^{T2}* (Monvoisin et al., 2006). Os descendentes deste cruzamento foram genotipados para seleção dos animais com um dos alelos *Dll4* flanqueado por locais *loxP* (*Dll4^{lox/wt}*). Foi ainda realizada a genotipagem para a mutação *VE-cadherin-Cre-ER^{T2}* de modo a saber se a administração de tamoxifeno levaria (Cre⁺) ou não (Cre⁻) à deleção de um dos alelos do gene *Dll4*, especificamente nas células endoteliais.

3.3. Procedimentos e reagentes específicos do trabalho experimental I

3.3.1. sDll4Fc

A forma solúvel do ligando Dll4 (sDll4Fc) induz angiogénese não-funcional (Scehnet et al., 2007).

Presumivelmente a terapia anti-Dll4 com a proteína de fusão solúvel sDll4Fc atua por ocupar os recetores Notch1 e Notch4, sem os ativar, impedindo a ligação do ligando completo endógeno, localizado na membrana citoplasmática de células vizinhas.

O sDII4Fc é uma proteína recombinante humana que resulta da fusão do domínio extracelular do ligando DII4 humano com o domínio Fc das imunoglobulinas G humanas. Este domínio Fc, também conhecido por fração cristalizável, confere importantes funções biológicas efectoras à proteína de fusão, nomeadamente, a capacidade de ligação a moléculas do complemento e a interação com macrófagos através do seu recetor membranar específico para o Fc. A presença deste domínio Fc confere ainda importantes vantagens farmacológicas, como o aumento do tempo de semi-vida plasmático, diminuição da velocidade de eliminação renal e aumento da solubilidade e estabilidade da molécula ligada.

A molécula sDII4Fc foi produzida como descrito previamente (Scehnet et al., 2007).

O gene humano *DII4* completo foi clonado a partir de ADNc humano, extraído de tecido pulmonar fetal e amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) (Clontech, Mountain View, CA). Quer a proteína completa (com os resíduos aminoacídicos 1-486), quer o domínio extracelular C-terminal com uma cauda de histidina (*His-tagged*) foram clonados no vetor de expressão pcDNA3.1 (Invitrogen). A proteína de fusão Fc foi clonada no vetor pCXFc (Invitrogen). Estes vetores de expressão foram posteriormente transfectados em células de ovário de hamster chinês ChoK (ATCC – *American Type Culture Collection*) através da utilização de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) para produzir as proteínas de interesse. A purificação da proteína de fusão foi realizada por passagem do lisado celular por uma coluna de níquel-NTA (*nitrilotriacetic acid*), com elevada afinidade para a cauda de histidina e por uma coluna de *sepharose* com proteína-A ligada, que interage com a fração Fc (Kertesz et al., 2006; Scehnet et al., 2007).

A molécula sDII4Fc foi gentilmente cedida pelo colaborador Dr. Parkash S. Gill (University of Southern California, Los Angeles, California, Estados Unidos da América).

3.3.2. Doxorrubicina

Uma vez que as terapias anti-angiogénicas nunca são administradas isoladamente é importante verificar se diminuem ou não a disponibilidade de agentes quimioterápicos, habitualmente administrados por via endovenosa, no tumor (Van der Veldt et al., 2012).

Para a terapia de combinação, escolhemos como molécula quimioterápica a doxorrubicina.

A doxorrubicina é um antibiótico antracíclico produzido por *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Exerce a sua ação citostática por ser uma molécula com capacidade para se intercalar no ADN e estabilizar o complexo TopoisomeraseII-ADN, impedindo dessa forma a síntese proteica (Bodley et al., 1989; Chaires, Dattagupta, & Crothers, 1982). Durante a ativação microsomal, a doxorrubicina produz intermediários radicais livres semiquinona que podem reagir com o oxigénio molecular para formar superóxido e outros radicais livres do oxigénio

que iniciam a peroxidação dos lípidos de membrana e, como tal, constituem outro mecanismo pelo qual a doxorubicina exerce o seu efeito (Doroshov, 1986; Sinha, Dusre, Collins, & Myers, 1989; Sinha, Trush, Kennedy, & Mimnaugh, 1984).

Ao contrário de outros quimioterápicos, que conduzem a imunodepressão, a doxorubicina apresenta um interessante efeito imunomodulador, nomeadamente, tem capacidade para estimular a atividade tumoricida dos linfócitos T citotóxicos e dos macrófagos. Outro dado importante é o facto deste quimioterápico ser transportado por macrófagos em grânulos citoplasmáticos (Haskill, 1981; Maccubbin et al., 1992).

A utilidade da doxorubicina no tratamento do cancro da próstata resistente a hormonas e de outros tipos de cancro, foi já documentada (Bagley Jr. et al., 2002; Booser & Hortobagyi, 1994; Harris, Harney, & Small, 2002; Kouroussis et al., 2005; Newling, 1992; Toulmonde, Demolish, & Houede, 2010; R. C. Young, Ozols, & Myers, 1981). A utilização desta molécula em fases mais iniciais do cancro prostático, não se tem revelado muito benéfica, uma vez que apenas cerca de 10% das células epiteliais prostáticas se encontram em divisão ativa, não beneficiando da sua capacidade citostática. Em fases mais avançadas, o efeito imunomodulador da doxorubicina pode ser benéfico (Denmeade & Isaacs, 2002).

A doxorubicina foi gentilmente cedida pelo Hospital Veterinário Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.

3.3.3. Recolha e processamento dos tumores prostáticos

3.3.3.1. Recolha da próstata e avaliação do crescimento tumoral

Para avaliar o crescimento tumoral prostático e para realizar a análise histológica da morfologia vascular tumoral, dois dias após a última administração, os murganhos TRAMP tratados e não tratados foram humanamente sacrificados por deslocamento cervical.

As glândulas prostáticas, dissecadas do restante aparelho génito-urinário e lavadas em PBS, foram divididas em duas partes iguais, uma para processamento histológico e outra para extração de ARN (ácido ribonucleico).

Após a fixação e desidratação da parte destinada ao processamento histológico, foi realizada a pesagem do tecido e o valor obtido multiplicado por dois de modo a obter uma estimativa do peso total da próstata. O peso assim estimado, foi comparado com o peso padrão de glândulas prostáticas de animais C57BL/6 *WT* às 18 e às 24 semanas de idade. A diferença observada entre os pesos das próstatas com (TRAMP) e sem (C57BL/6) tumores foi usada como medida da carga tumoral para cada idade avaliada.

3.3.3.2. Processamento histológico dos tecidos para imunohistoquímica

As próstatas recolhidas para imunohistoquímica (IHQ) foram fixadas individualmente durante 48 horas em formalina tamponada de fosfato neutra a 10%. Após lavagem em PBS, desidratação em etanol e diafanização em xileno, as amostras foram incluídas em parafina.

3.3.3.3. Processamento histológico dos tecidos para imunofluorescência

As próstatas recolhidas foram fixadas numa solução de 4% (p/v) paraformaldeído (PFA) (Sigma-Aldrich, P6148) e 4% de sucrose (Sigma-Aldrich, S0389) em PBS a 4°C durante uma hora com agitação. Os tecidos fixados foram depois desidratados numa solução de 15% de sucrose em PBS a 4°C, durante cerca 16 horas com agitação. Após a desidratação, a inclusão foi feita por imersão numa solução de 15% sucrose e 7,5% gelatina (*Gelatin from porcine skin, Type A*, Sigma-Aldrich, G2500) em PBS, no banho-maria a 37°C durante 1 hora. Após a inclusão, os tecidos foram dispostos em placas de Petri e imersos numa solução de gelatina idêntica, que foi deixada solidificar à temperatura ambiente durante uma hora para posteriormente cada próstata ser isolada num bloco de gelatina.

Cada bloco, devidamente identificado, foi congelado por imersão em isopentano (Sigma-Aldrich, 1.06056.1000) a -80°C e armazenado a esta temperatura, até ser processado no crióstato.

A inclusão dos tecidos num bloco de gelatina permite definir a orientação do corte e, após congelação, fornece uma matriz rígida com margens adequadas em redor dos tecidos.

3.3.3.4. Microtomia

As secções de tecido prostático para análise por IHQ foram obtidas por seccionamento num micróto mo das amostras prostáticas incluídas em parafina. As secções obtidas (com 3 mm) foram montadas em lâminas Superfrost™ Plus Menzel-Gläser (VWR, 631-9483).

As secções de tecido prostático para análise por imunofluorescência foram obtidas por crio secção dos blocos de gelatina congelados. Os blocos armazenados a -80°C foram transferidos para o interior da câmara do crióstato Leica CM3050S a -30°C, pelo menos 30 minutos antes de iniciar o trabalho. Foram realizadas crio secções com 20 µm. Cada 3 cortes sucessivos foram transferidos para 3 lâminas adesivas Superfrost™ Plus de modo a obter 3 lâminas gémeas, isto é, com secções de tecido equiparáveis em termos de organização histológica. Para cada lâmina foram recolhidas 10 secções. Após um período de cerca 30 minutos, à temperatura ambiente num local protegido, as lâminas com as secções devidamente aderidas foram armazenadas a -20°C.

3.3.4. Análise histológica

3.3.4.1. Preparação das secções de parafina

A localização espacial da expressão de Dll4, nas amostras prostáticas, foi avaliada por IHQ de acordo com o método previamente publicado (Silva et al., 2010).

As secções de parafina nas lâminas foram desparafinizadas por imersão em xileno (1× 10 minutos, 1× 5 minutos) e de seguida reidratadas por imersão em concentrações decrescentes de etanol (etanol 100%: 2× 2 minutos; etanol 95%: 1× 4 minutos; etanol 75%: 1× 4 minutos).

Para inibir a ação de peroxidases endógenas e promover uma melhor fixação, as lâminas com as secções foram imersas numa solução de 3% (v/v) de peróxido de hidrogénio a 30% (VWR, 1.07298.0250) em metanol (VWR, 1.06009.2511), durante 30 minutos à temperatura ambiente (no escuro).

A recuperação antigénica foi realizada incubando as lâminas em tampão citrato 10 nM, pH = 6, durante 5 minutos à temperatura ambiente, e, seguidamente, num micro-ondas a 560 W durante 15 minutos. As lâminas foram depois arrefecidas durante 20 minutos à temperatura ambiente. De seguida as lâminas foram lavadas em tampão de imunohistoquímica (0,8 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 2,68 mM KCl, 137 mM NaCl) adicionado de 0,3% (v/v) de Triton[®]X-100 (*polyethylene glycol tertoctylphenylether*, Fluka, 93426), pH 7,2-7,4, durante 5 minutos e posteriormente incubadas com a solução proteica de bloqueio (Novocastra, Leica Biosystems, New Castle Ltd., United Kingdom) durante 5 minutos de modo a bloquear locais de ligação inespecíficos.

3.3.4.2. Imunohistoquímica

A imunomarcação foi realizada em secções histológicas consecutivas obtidas tal como descrito em 3.3.4.1.

Após o período de incubação com a solução de bloqueio escooreu-se bem a referida solução e procedeu-se à incubação, durante a noite a 4°C, das secções com o anticorpo primário, neste caso um anticorpo policlonal de coelho anti-Dll4 murino (Abcam[®], ab7280) diluído na razão de 1:200. Este anticorpo foi previamente validado noutros tecidos do aparelho reprodutor, quer masculino, quer feminino, em trabalhos publicados pelo nosso laboratório (Murta et al., 2013, 2015; Murta, Batista, Silva, et al., 2014; Murta, Batista, Trindade, et al., 2014; A.-R. Pedrosa et al., 2016).

No dia seguinte, após lavagem em tampão de IHQ, as lâminas foram incubadas durante uma hora com o anticorpo secundário policlonal de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Dako, P 0448) diluído na razão de 1:100 em tampão de IHQ. Após uma lavagem de 10 minutos em tampão de IHQ, a reação colorimétrica foi iniciada por adição do substrato

cromogénico DAB (ImmPACT™ DAB, Vector Laboratories), de acordo com as instruções do fabricante, e aguardou-se até que uma coloração adequada fosse alcançada.

Por fim, as lâminas foram lavadas sob água corrente durante 5 minutos e os núcleos celulares foram contrastados por imersão em hematoxilina de Mayer (Fluka AG Buchs SG) durante 30 segundos a 1 minuto. De seguida as secções de tecido foram desidratadas por imersão em etanol (95% e 100%, 2 minutos em cada) e xileno (2× 5 minutos) e as lâminas montadas com Entellan® (107960, Merck Millipore).

Nos controlos negativos o anticorpo primário foi omitido ou substituído por soro de cabra (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark).

3.3.4.3. Preparação das criosecções

Três lâminas gêmeas com as criosecções de próstata, de cada murganho, foram descongeladas à temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Para remover a gelatina, as lâminas foram imersas em PBS a 37°C, durante 15 minutos. Após este período, foram realizadas duas lavagens, de 5 minutos cada, em PBS à temperatura ambiente. Seguidamente, para inibir a ação de peroxidases endógenas e promover uma melhor fixação, os tecidos foram imersos numa solução de 3% (v/v) de peróxido de hidrogénio a 30% em metanol, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período foram feitas duas lavagens de 5 minutos cada, por imersão em PBS.

A permeabilização das secções foi conseguida através da imersão numa solução de Triton®X-100 a 0,1% em PBS durante 10 minutos, duas vezes.

Para o bloqueio de reações de ligação inespecíficas, as lâminas foram dispostas na horizontal, numa câmara húmida. Durante uma hora, à temperatura ambiente, as secções de tecido de cada lâmina ficaram cobertas por 200 µL de uma solução de 2% (p/v) de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich®, A7906) e 5% (v/v) de soro de cabra inativado (Sigma-Aldrich®, G9023) em PBS adicionado de Tween® 20 (Sigma-Aldrich®, P9416) a 0,1% (v/v).

3.3.4.4. Imunofluorescência indireta

Por imunofluorescência indireta avaliámos a densidade e maturidade vascular, e a apoptose; por imunofluorescência direta foi avaliada a perfusão, extravasação e proliferação em criosecções representativas.

Após uma hora de bloqueio escoadou-se a referida solução, e com as lâminas já dispostas novamente na horizontal na câmara húmida, as secções foram cobertas por 100 µL de solução de bloqueio adicionada dos anticorpos primários diluídos em concentrações específicas previamente testadas.

Para examinar a densidade e maturidade vascular, realizou-se imunomarcção dupla para PECAM (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*) e para α -SMA (*alpha Smooth Muscle Actin*), moléculas específicas das células endoteliais e dos perícitos, respetivamente (Ilan, Cheung, Pinter, & Madri, 2000; Skalli et al., 1989).

Para avaliar a proporção de células em apoptose, realizou-se uma imunomarcção para caspase-3 (CPP-32, Apoptain, Yama, SCA-1), um executor crítico da apoptose, por ser total ou parcialmente responsável pela clivagem proteolítica de muitas proteínas chave, entre elas a enzima nuclear poly (ADP-ribose) polimerase (PARP) (Fernandes-Alnemri, Litwack, & Alnemri, 1994); note-se que a ativação da caspase-3 requer o processamento proteolítico do seu zimogéneo inativo nos fragmentos p17 e p12 ativados (Nicholson et al., 1995). Para avaliar a proporção de células em proliferação, realizou-se a imunomarcção para Ki67, uma proteína nuclear presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas ausente nas células em repouso (G0) (Gerdes, Schwab, Lemke, & Stein, 1983; Starborg, Gell, Brundell, & Hoog, 1996)

Para esta marcação, foram usados como anticorpos primários: anticorpos monoclonais de rato anti-PECAM de murganho (BD Pharmingen[™], 557355) diluídos na razão de 1:100; soro policlonal de coelho anti- α -SMA de murganho (Abcam[®], ab5694) diluído na razão de 1:50; anticorpos monoclonais de coelho anti-caspase-3 ativa (# 9664S, Cell signaling Technology) diluídos na razão de 1:100 e anticorpos monoclonais de rato anti-Ki67 conjugado com eFluor[®] 570 (cat. no. 41-5698-80 eBiosciences Inc., CA, USA) diluídos na razão de 1:100.

As lâminas foram depois cobertas com lamelas de vidro e incubadas na câmara húmida a 4°C durante a noite.

Para remoção dos anticorpos primários não ligados, em excesso, no dia seguinte foram realizadas 5 lavagens, de 10 minutos cada, por imersão numa solução de 0,1% de Tween[®] 20 em PBS. As lamelas foram removidas com a primeira lavagem.

Após a última lavagem, escoou-se muito bem a solução de lavagem da superfície das lâminas e com estas novamente na horizontal, na câmara húmida, distribuiu-se 100 μ l de solução de bloqueio com os anticorpos secundários diluídos em concentrações previamente testadas. Estes anticorpos, específicos para a espécie em que foram produzidos os anticorpos primários, apresentam-se conjugados com fluorocromos Alexa Fluor[®]. Como anticorpos secundários usámos: anti-IgG de rato com Alexa Fluor[®]488 (Invitrogen[™] Molecular Probes[®], A-11006) ou anti-IgG de rato com Alexa Fluor[®]555 (Invitrogen[™] Molecular Probes[®], A-21434), diluídos na razão de 1:300, para detetar o anticorpo primário ligado a PECAM; anti-IgG de coelho com Alexa Fluor[®]555 (Invitrogen[™] Molecular Probes[®], A-21428), diluído na razão 1:300, para detetar o anticorpo primário ligado a α -SMA e anti-IgG de coelho com Alexa Fluor[®]488

(Invitrogen™ Molecular Probes® A-11008), diluído na razão de 1:200 para detetar o anticorpo primário ligado ao fragmento p17 ativo da caspase-3.

As lâminas, sem lamelas de vidro a cobrir, foram incubadas na câmara húmida à temperatura ambiente, no escuro, durante uma hora.

Para remoção dos anticorpos secundários não ligados, em excesso, foram depois realizadas 3 lavagens, de 10 minutos cada, por imersão em PBS.

De seguida, para marcar os núcleos celulares, as secções foram imersas numa solução de 0,15% (v/v) de DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*, Molecular Probes®, D1306) em PBS durante 3 minutos. De seguida realizaram-se 2 lavagens de 10 minutos cada em PBS.

A preparação da solução de DAPI encontra-se descrita no anexo I.

Depois de escorrer bem o PBS da última lavagem, as lâminas foram montadas com Mowiol. Para tal, distribuiu-se 90 µL da solução de Mowiol (descrita no anexo I) sobre a lâmina e cobriu-se cuidadosamente com lamela de vidro de modo a não existirem quaisquer bolhas de ar entre a lâmina e a lamela.

As lâminas montadas foram armazenadas na câmara húmida a 4°C, protegidas da luz.

3.3.4.5. Avaliação da perfusão e extravasação vascular

Para avaliar histologicamente a perfusão e extravasação vascular, foi necessário administrar lectina ou Azul de Evans, respetivamente, antes do sacrifício dos animais.

De cada grupo experimental, quatro animais foram anestesiados por administração intraperitoneal de 300 µL de uma solução de 2,5% de avertina (anexo I) em PBS estéril.

Para avaliar a extravasação vascular, em dois dos animais anestesiados, administrou-se 200 µL de uma solução de 1% de azul de Evans (*Evans' Blue*, Sigma-Aldrich®, E2129) em PBS estéril, na veia da cauda. O azul de Evans emite fluorescência vermelha que pode ser visualizada em contraste com estruturas marcadas com fluorescência verde. Assim, nas secções das próstatas obtidas destes animais, foi realizada imunofluorescência indireta (descrita na secção anterior) para avaliação concomitante da densidade vascular (marcação para PECAM). Apenas o sinal emitido pelo azul de Evans adjacente a estruturas vasculares foi considerado na quantificação da extravasação.

Para avaliar a perfusão vascular, nos outros dois animais anestesiados, administrou-se 100 µL de uma solução de 0,1% (p/v) de lectina biotinilada (*lectin biotinylated from Lycopersicum esculentum*, Sigma-Aldrich®, L0651) em PBS estéril, na veia da cauda. A lectina biotinilada é retida no interior dos vasos sanguíneos por se ligar com elevada afinidade a oligómeros de N-acetil-β-D-glucosamina presentes na face luminal das membranas celulares endoteliais. Por se apresentar conjugada com biotina, a sua deteção histológica posterior é conseguida através da

utilização de estreptavidina conjugada com Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen[™] Molecular Probes[®], S-32354) diluída na razão de 1:200 em solução de bloqueio, na fase de incubação com os anticorpos primários, não sendo posteriormente usado qualquer anticorpo secundário. Nas secções obtidas destes animais, a densidade vascular foi avaliada através da marcação do anticorpo primário ligado a PECAM (BD Pharmingen[™], 557355) com o anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com Alexa Fluor[®]555 (Invitrogen[™] Molecular Probes[®], A-21434). A perfusão vascular foi quantificada através da determinação da percentagem de estruturas PECAM positivas (Alexa Fluor[®] 555) que apresentavam co-localização com sinal Alexa Fluor[®] 488 (conjugado com a estreptavidina que se ligou à lectina biotinilada).

Após a administração endovenosa de azul de Evans ou de Lectina, permitiu-se a circulação durante 5 minutos antes de realizar a perfusão transcardíaca com uma solução de 4% (p/v) de PFA em PBS estéril durante 3 minutos. Os animais foram depois humanamente sacrificados por deslocamento cervical e procedeu-se à recolha e processamento dos tecidos, tal como descrito nas secções anteriores.

3.3.4.6. Microscopia

As secções marcadas por imunohistoquímica foram observadas num microscópio Olympus BX51 com as objetivas secas de 10×/0.30 NA e 40×/0.75 NA. A captura de imagem foi conseguida com o equipamento fotográfico Olympus DP21 (Olympus Iberia, Inc). acoplado.

As secções imunomarcadas por fluorescência foram examinadas num microscópio de fluorescência (Leica DMRA2) com as objetivas secas de 10 e 20×/0.5 NA Leica HC PL Fluotar (Leica, Heidelberg, Germany), e as imagens das regiões de interesse foram capturadas com a câmara Photometrics CoolSNAP HQ, (Photometrics, Friedland, Denmark) e processadas no programa informático Metamorph 4.6–5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Após transformação das imagens capturadas em formato RGB em ficheiros binários no programa Adobe Photoshop CS5, as análises morfométricas foram realizadas utilizando o programa NIH ImageJ 1.37v.

A densidade vascular foi medida como a percentagem de cada campo, do tecido tumoral fotografado, ocupada por um sinal positivo (pixéis brancos) para PECAM.

Como medida da maturidade vascular, o recrutamento de células murais foi determinado por quantificação da percentagem de estruturas positivas para α -SMA que se encontravam alinhadas com um sinal positivo para PECAM.

A extravasação, foi medida como a percentagem de cada campo com estruturas positivas para o azul de Evans (a emitir fluorescência vermelha) imediatamente paralelas às estruturas positivas para PECAM.

Em relação à perfusão vascular esta foi quantificada como a percentagem de cada campo ocupada por estruturas com co-localização de sinais positivos para PECAM e para estreptavidina ligada à lectina biotinilada.

O índice de proliferação e o índice apoptótico foram determinados como a proporção de células positivas, isto é, que emitem sinal fluorescente, entre um total de 1000 núcleos neoplásicos contados em 10 campos de observação escolhidos aleatoriamente na ampliação de 400×

3.3.5. Análise quantitativa da transcrição genética

3.3.5.1. Processamento dos tecidos

Para avaliar potenciais alterações na transcrição de moléculas envolvidas na angiogénese tumoral, uma parte (referida em 3.3.3.1.) do tecido prostático recolhido de cada animal foi imediatamente congelada em azoto líquido e armazenada a -80°C, para posterior extração de ARN.

3.3.5.2. Extração e quantificação do ARN

Para isolar o ARN total do tecido tumoral prostático, foi utilizado um kit comercial, o *RNeasy® mini-kit* (Qiagen®, 74104), realizando-se a extração de duas amostras em paralelo de cada vez, de acordo com as instruções do fabricante. A eluição final foi feita em 30 µL de água bidestilada livre de nucleases, fornecida com o kit. As amostras de ARN assim obtidas foram armazenadas a -80°C.

Previamente à sua utilização, o ARN extraído foi quantificado e avaliado o seu grau de pureza por espectrofotometria no espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific). Neste aparelho é lida a absorvância de 1 µL da amostra a 230 nm, 260 nm e 280 nm (A_{230} , A_{260} , A_{280}). Os ácidos nucleicos puros apresentam um pico de absorvância a 260 nm, o que permite ao aparelho estimar a sua concentração através da aplicação de um algoritmo com a lei de Lambert-Beer. No caso de uma amostra pura de ARN a proporção das $A_{230:260:280}$, deverá ser 1:2:1 e o quociente A_{260}/A_{280} deverá ser entre 1,9 e 2,0, como foi o caso observado em todas as amostras testadas.

3.3.5.3. Transcrição reversa – síntese de ADNc

Para obter o ADN complementar (ADNc) de cadeia simples foi realizada uma reação de transcrição reversa sobre 400 ng do ARN total extraído, com o kit comercial SuperScript® III *First-strand synthesis supermix for qRT-PCR* (Alfagene, SKU# 11752-052). Além da enzima transcriptase reversa e do seu tampão, este kit tem ainda uma pré-mistura de oligonucleótidos oligo(dT)20 e oligonucleótidos hexâmeros aleatórios que funcionam como sequências

iniciadoras da transcrição. É também fornecida uma enzima (*Escherichia coli RNase H*), que faz a degradação de eventuais quantidades residuais de ARN que possam existir no final da reação, garantindo assim a obtenção de uma amostra pura de ADNc. A mistura para cada uma das reações e as condições da reação foram as fornecidas pelas instruções do fabricante.

3.3.5.4. PCR em tempo real

O PCR em tempo real (também conhecido por PCR cinético ou PCR quantitativo) tem vantagens sobre o PCR tradicional uma vez que é possível registar a concentração de amplificação à medida que a reação progride (Whitman & Dunbar, 2008).

A cinética da acumulação de fluorescência no decorrer dos ciclos térmicos da reação de amplificação, está diretamente relacionada com o número de cópias inicial de ADN molde. Quanto menor o número de ciclos necessários para produzir fluorescência detetável, maior o número inicial de sequências alvo no ADN molde (Higuchi, Fockler, Dollinger, & Watson, 1993).

No PCR em tempo real são adicionadas à reação moléculas fluorescentes com capacidade de intercalar o ADN. A intensidade do sinal fluorescente emitido aumenta com o aumento da ligação a ADN de cadeia dupla e a fluorescência total resultante aumenta com o aumento do número de moléculas de cadeia dupla, de acordo com o número de ciclos de amplificação (Whitman & Dunbar, 2008).

O SYBR[®] Green (Invitrogen[™], Carlsbad, CA), um corante cianina assimétrico, ciclicamente substituído, é a molécula fluorescente intercaladora mais usada (Bengtsson, Karlsson, Westman, & Kubista, 2003; Zipper, Brunner, Bernhagen, & Vitzthum, 2004).

Para avaliar alterações na transcrição de genes envolvidos na angiogénese tumoral, nos animais tratados e não tratados, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando como molde 3,25 ng de ADN complementar obtido como descrito em 3.7.3. As sequências oligonucleotídicas iniciadoras para os genes *Vegf-A*, *Vegf-C*, e β -actina, e o modo de preparação das misturas de PCR em tempo real encontram no anexo III.

As reações foram preparadas com o kit comercial *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix[®]* (Applied Biosystems[®], 4368706) de acordo com as instruções do fabricante. Este *kit* contém um agente intercalador do ADN, o *SYBR[®] Green I*, AmpliTaq Gold[®] (ADN polimerase), dNTPs e a pré-mistura de tampão específico da enzima Taq polimerase, bastando assim adicionar as sequências oligonucleotídicas iniciadoras (que flanqueiam os genes de interesse) e o ADN molde (ADNc) do tecido tumoral de cada animal. De forma a evitar a formação de dímeros e amplificações inespecíficas, usou-se uma quantidade mínima de oligonucleótidos iniciadores.

Cada reação de amplificação foi realizada em triplicado e realizou-se uma reação controle negativo (anexo III) para cada gene.

As condições de amplificação usadas foram iguais em todas as reações, uma vez que as sequências oligonucleotídicas iniciadoras foram escolhidas de forma a terem a mesma temperatura de hibridação. O termociclador StepOne™ (Applied Biosystems®) foi programado para realizar um passo de desnaturação e ativação da polimerase do ADN, AmpliTaq, a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C e 1 minuto de emparelhamento e extensão a 60°C. No fim do protocolo seguiu-se um passo de desnaturação sucessiva a temperaturas crescentes, até que, no ponto em que as cadeias se separam/dissociam, verifica-se uma diminuição brusca da fluorescência. A temperatura a que isto acontece (T_m) está relacionada com o comprimento da molécula de ADN, pelo que moléculas iguais têm T_m iguais. O objetivo da realização desta curva de dissociação (*melting curve*) foi verificar se em cada reação foi amplificado apenas um fragmento e se este foi igual em todas as reações de amplificação de um determinado gene, permitido assim avaliar a especificidade da reação.

A análise dos resultados foi realizada com o programa StepOne™ Software v2.2.2. Para cada amostra em análise foi obtido um valor de *cycle threshold* (CT), correspondente ao número de ciclos necessário para alcançar a quantidade de amplicão que permite iniciar a fase exponencial de emissão de fluorescência. Este valor de CT é inversamente proporcional ao número de cópias do gene em análise, presente no ADN molde utilizado. Os resultados apresentados representam a média das reações de amplificação específicas (apenas um produto de amplificação). Em todas as reações a expressão genética foi normalizada para β -actina.

3.3.6. Quantificação da doxorrubicina tumoral total

3.3.6.1. Extração da doxorrubicina tumoral

A quantidade total de doxorrubicina presente no tumor foi quantificada utilizando um método semelhante ao descrito por Mayer e colegas (Mayer, Dougherty, Harasym, & Bally, 1997).

No final de cada ensaio, foi preparado um homogeneizado a 10% (p/v) de tecido tumoral, recolhido de cada murgancho que foi tratado com doxorrubicina livre, em tampão de lise de tecidos. Uma amostra (200 μ L) do homogeneizado foi colocada num microtubo de centrífuga de 2 mL e adicionou-se 100 μ L de Triton X-100 a 10% (v/v), 200 μ L de água, e 1500 μ L de isopropanol acidificado (0,75 N HCl). Após a mistura completa por agitação no *vortex*, o homogeneizado foi incubado a -20°C durante a noite. No dia seguinte, após os microtubos serem aquecidos até à temperatura ambiente foram agitados durante 5 minutos no *vortex*. De seguida, realizou-se uma centrifugação a 15000 $\times g$ durante 20 minutos numa centrífuga de

bancada. O sobrenadante foi eliminado e a fase orgânica (inferior; com a doxorrubicina extraída) foi armazenada nos microtubos a -80°C até ser quantificada por espectrofotometria (Laginha, Verwoert, Charrois, & Allen, 2005).

3.3.6.2. Espectrofotometria

A doxorrubicina foi quantificada fluorometricamente ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) num espectrofotómetro.

Este quimioterápico pertence a uma família de moléculas anfífilas que possuem um grupo hidroxilo substituído por um cromóforo antraquinona e uma cadeia lateral aminoglicosídica. As suas propriedades fluorescentes são frequentemente utilizadas para monitorizar a sua localização (Karukstis, Thompson, Whiles, & Rosenfeld, 1998).

Para corrigir a fluorescência inespecífica de fundo, a fluorescência emitida pelas amostras foi comparada com uma curva padrão feita a partir da fluorescência emitida por quantidades conhecidas de doxorrubicina adicionadas a extratos isopropanólicos acidificados de tecido tumoral homogeneizado de murganhos TRAMP não tratados. Um extrato isopropanólico sem doxorrubicina adicionada foi usado como amostra controlo (branco).

Os resultados apresentados estão expressos em microequivalentes de doxorrubicina total/g de tecido, uma vez que este método não tem capacidade para distinguir entre doxorrubicina e metabolitos fluorescentes da doxorrubicina.

3.3.7. Citometria de fluxo

Para avaliar o efeito dos tratamentos descritos em 3.4, nas populações celulares imunitárias, foi recolhido o baço após o sacrifício dos animais.

A marcação por anticorpos específicos foi realizada em DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*) suplementado com 3% de soro fetal bovino (SFB).

Para as células T e B, foram utilizados os seguintes anticorpos anti-*mouse*: CD4 AlexaFluor[®]488 (L3T4) (53-0041), CD8 AlexaFluor[®]488 (clone 53-6.7) (53-0081), CD3 AlexaFluor[®]488 (clone 145-2C11) (53-0031), CD19 AlexaFluor[®]700 (1D3) (56-0193) e CD45 AlexaFluor[®]700 (clone 2D1) (56-0451). Para as populações de granulócitos/monócitos foram utilizados anticorpos anti-*mouse*: Gr1 AlexaFluor[®]488 (RB6-8C5) (53-5931) e Cd11b AlexaFluor[®]488 (M1/70) (53-0112) (todos da Affimetrix, eBioscience).

As células marcadas foram adquiridas num citómetro de fluxo FACSCalibur[™] (BD Biosciences) e os dados foram analisados utilizando o *software* FlowJo vX.0.7 (Tree Star)

3.4. Procedimentos e reagentes específicos do trabalho experimental II

3.4.1. Células de melanoma murino B16-F10

No presente trabalho foram utilizadas células de melanoma murino da linha B16-F10 adquiridas à ATCC (ATCC® CRL-6475™) (Briles & Kornfeld, 1978; Fidler & Bucana, 1977; Fidler, Darnell, & Budmen, 1976; Fidler & Kripke, 1977; Fidler, 1973, 1975) para estabelecer um modelo de metastização em murganhos C57BL/6 e *Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre-ER^{T2}*.

Um dos sistemas mais usados para estudar as propriedades das células neoplásicas, e/ou dos seus hospedeiros singênicos, que determinam os padrões de metastização, sobrevivência em circulação e crescimento das células neoplásicas no local metastático, é o que utiliza as variantes da linha celular B16 de melanoma maligno (Dua, Ingle, & Gude, 2007; Eklund et al., 2013; Fidler, 1973, 1975; Giavazzi & Garofalo, 2001; Y. Huang et al., 2009; Salinas-Jazmín et al., 2010; Stellas, Karameris, & Patsavoudi, 2007; Yoshiura, Nishishita, Nakaoka, Yamashita, & Yamashita, 2009; T. Zhou, Hu, Zhou, Fu, & Wang, 2009).

A linha celular B16-F1 foi derivada do isolamento de colônias metastáticas pulmonares que se formaram por inoculação endovenosa de células de melanoma B16 (um melanoma que surgiu espontaneamente em murganhos C57BL/6 no Jackson Laboratory em 1954) em murganhos da estirpe C57BL/6. Depois da adaptação à cultura *in vitro*, as células B16-F1 foram inoculadas por via endovenosa em murganhos singênicos (C57BL/6) e o processo foi repetido. Após nove seleções *in vivo*, foi obtida uma linha variante, a F10, com capacidade para produzir um número muito maior de metástases pulmonares do que a B16-F1 após a inoculação endovenosa. Ou seja, por repetidas (dez) passagens *in vivo* foi obtida uma linha celular (a B16-F10) com elevado potencial de crescimento e de sobrevivência *in vivo*. A subcultura prolongada *in vitro* destas linhas celulares não afeta as suas propriedades metastáticas (Fidler & Nicolson, 1977; Fidler, 1973).

A B16-F1 é assim uma linha celular neoplásica com baixa propensão metastática e a B16-F10 é uma linha celular com elevado potencial metastático após a administração endovenosa; a linha B16-BL6, é uma linha celular neoplásica relacionada com as duas anteriores que foi selecionada *in vitro* pela sua capacidade invasiva da parede de bexiga murina e produz uma elevada incidência de metástases espontâneas após implantação subcutânea na almofada plantar (Hart, 1979; Nathanson, Haas, Mead, & Lee, 1986; J. E. Talmadge & Fidler, 1982). As 3 variantes do melanoma B16 são todas usadas em ensaios de metastização experimental, mas para ensaios de metastização espontânea são usadas sobretudo as B16-BL6 (Giavazzi & Garofalo, 2001) por este ser um clone mais invasivo localmente, com maior propensão a metastizar precocemente

do que as variantes de crescimento mais lento e menos invasivas F1 e F10 (Nathanson et al., 1986).

Contudo, a linha celular B16-F10 tem sido utilizada em modelos de metastização singênicos quer experimentais (administração endovenosa na veia lateral da cauda) quer espontâneos. Nos modelos de metastização espontânea, têm sido utilizados diversos locais de implantação subcutânea (Bobek et al., 2010, 2011; Hawkins et al., 2002; Salinas-Jazmín et al., 2010; Skuli et al., 2009), mas também tem sido utilizada a implantação intradérmica (ortotópica) (Y. Huang et al., 2009; Neville & Pezzella, 1994). Em todos os modelos de implantação subcutânea esta linha celular metastiza preferencialmente para os pulmões e linfonodos regionais. No caso dos implantes ortotópicos (intradérmicos) está descrita a metastização espontânea para os linfonodos (Morris, Percy, Lizardo, Chambers, & MacDonald, 2013; Trites et al., 2000).

Outra das razões para a escolha desta linha celular é a facilidade com que é possível localizar os focos metastáticos de coloração negra (contrastante com a do parênquima pulmonar rosado ou dos linfonodos esbranquiçados) devido à produção de melanina por estas células (Giavazzi & Garofalo, 2001).

Com vista ao objetivo deste trabalho, é ainda importante salientar que foi já demonstrado que angiogénese desempenha um papel crítico na metastização linfática e hematogénica dos melanomas (Neitzel, Neitzel, Magee, & Malafa, 1999). Outro dado importante é o fato de as lesões metastáticas de melanoma terem uma vascularização sanguínea superior à vascularização linfática, ao contrário do que se observa no melanoma primário (Mihic-Probst et al., 2012).

3.4.1.1. Cultura *in vitro* e criopreservação

Com vista ao estabelecimento de lote com alíquotas prontas a usar nos ensaios de metastização, foram realizadas duas passagens das células B16-F10 recebidas do ATCC®.

Um dos criotubos com células B16-F10, foi descongelado em banho-maria a 37°C (Nüve bath nb5). A suspensão celular em meio de congelação foi aspirada para uma pipeta com 5 mL de meio de cultura (DMEM (Gibco™, 41965-039) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor (SFB; Gibco™, 16140-071) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco™, 15140-122) e transferida para um tubo de centrífuga (Greiner CellStar®, 191170). Posteriormente adicionou-se 1 mL de meio à ampola para ressuspender as células remanescentes e transferi-las para o mesmo tubo de centrífuga. Após uma centrifugação de 5 minutos a 200 ×g (Sigma Laborzentrifugen®3K10), o sobrenadante foi aspirado e o precipitado celular foi ressuspenso em 5 mL meio de cultura. Após nova centrifugação nas mesmas condições e remoção do sobrenadante por aspiração, o precipitado celular foi ressuspenso por

pipetagem em 10 mL de meio de cultura e dividido por dois frascos T75 (Thermo Scientific™ Nunc™ Cell Culture Treated EasYFlasks™, 156472). Posteriormente, adicionou-se mais 15 mL de meio de cultura a cada frasco T75 e homogeneizou-se a suspensão celular por movimentos perpendiculares com o frasco apoiado na horizontal. A cultura foi incubada durante a noite na incubadora a 37°C com 5% CO₂. A linha celular B16-F10 é uma linha celular aderente que cresce em monocamada.

No dia seguinte, as células B16-F10 de cada frasco T75 foram passadas para cinco frascos T75. Após remoção do meio de cultura por aspiração, o tapete celular de cada frasco foi lavado duas vezes com 10 mL de PBS estéril (anexo I). Após aspiração cuidadosa do PBS da segunda lavagem, adicionou-se 3 mL de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco®, 25200-056) a cada T75 e os frascos foram colocados na horizontal na incubadora a 37°C com 5% CO₂ durante 5 minutos. As B16-F10 foram ressuspensas por pipetagem na solução de tripsina, aspiradas para uma pipeta com 7 mL de meio de cultura e transferidas para um tubo de centrifuga. Após centrifugação durante 5 minutos a 200 ×g, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado celular foi ressuspenso em 5 mL meio de cultura. Após nova centrifugação nas mesmas condições e remoção do sobrenadante por aspiração, o precipitado celular foi ressuspenso, por pipetagem, em 10 mL de meio de cultura e cada 2 mL foram transferidos para um frasco T75 onde tinha sido adicionado previamente 18 mL de meio de cultura. A suspensão celular foi homogeneizada por movimentos perpendiculares com o frasco apoiado na horizontal. A cultura foi incubada durante a noite na incubadora a 37°C com 5% CO₂.

No dia seguinte foi renovado o meio de cultura. Cerca de dois dias depois, quando foi alcançada a confluência de cerca 70-80% procedeu-se à preparação das células para criopreservação.

Após aspiração cuidadosa do meio de cultura e duas lavagens do tapete celular com PBS, as células foram destacadas por adição de 3 mL de tripsina-EDTA a 0,25% em cada frasco T75 e incubação a 37°C com 5% CO₂ durante 5 minutos. As B16-F10 foram ressuspensas por pipetagem na solução de tripsina, aspiradas para uma pipeta com 7 mL de meio de cultura e transferidas para um tubo de centrifuga. Após centrifugação durante 5 minutos a 200 ×g, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado celular resultante de cada frasco foi ressuspenso em 2 mL de meio de congelação (meio de cultura adicionado de 10% DMSO (Hybri-Max™, Sigma-Aldrich®, D2650)), por pipetagem com pipeta de Pasteur de vidro (Volac®, D812) de modo a assegurar a formação de uma suspensão celular de célula-única. A suspensão celular foi depois distribuída por ampolas de congelação (Nunc™, 377224) (1 mL/ampola) que ficaram armazenadas durante uma noite a -80°C antes de serem transferidas para o contentor de azoto líquido. Ficou assim constituído um lote de 20 alíquotas de células B16-F10 (cada uma com uma densidade correspondente a aproximadamente ½ T75).

3.4.1.2. Preparação da suspensão celular para inoculação

Cerca de 48 horas antes das inoculações, um criotubo com células B16-F10 foi descongelado e as células foram passadas para dois frascos T75 de acordo com o mesmo procedimento descrito em 3.4.1.1.

No dia seguinte, de manhã, o meio de cultura foi renovado. Cerca de 32 horas após a renovação do meio, quando as culturas atingiam cerca de 70% de confluência, os tapetes celulares dos dois frascos foram destacados por ação da tripsina-EDTA de acordo com o mesmo procedimento descrito em 3.4.1.1. Após a incubação a 37°C com 5% CO₂ durante 5 minutos, as B16-F10 foram ressuspensas por pipetagem na solução de tripsina, aspiradas para uma pipeta com 7 mL de meio de cultura e transferidas para um tubo de centrífuga. As suspensões celulares foram homogeneizadas nos tubos de centrífuga por pipetagem cuidadosa e de seguida retirou-se uma alíquota de 10 µL para um microtubo com 90 µL de PBS. Parte desta suspensão no microtubo foi depois transferida por capilaridade para cada área de contagem do hemocítmetro (câmara de Neubauer) previamente preparado. Através da observação da câmara no microscópio invertido, as células presentes nos quatro quadrados maiores de cada canto foram contadas e calculada a média do número de células por quadrado. O valor da média foi multiplicado por 10, que foi o fator de diluição usado, depois por 10⁴ (uma vez que cada quadrado da câmara tem um volume de 0,1 µL, multiplicando por 10⁴ obtemos a estimativa do número de células/mL) e pelo volume da suspensão celular (10 mL) para estimarmos assim a quantidade total de células B16-F10 presentes nos dois frascos T75.

Durante a contagem, a suspensão celular foi centrifugada a 200 ×g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após eliminação do sobrenadante por aspiração, o precipitado celular foi lavado por adição de 10 mL de meio de cultura e nova centrifugação nas mesmas condições. Após aspiração cuidadosa do último sobrenadante, o precipitado celular foi ressuspensão num volume adequado de PBS frio (estéril) de modo a obter a concentração de células necessária para cada ensaio. Esta ressuspensão foi feita pipetando gentilmente, várias vezes com pipeta de 2 mL de modo a obter uma suspensão celular de célula-única.

De seguida a suspensão celular em PBS foi distribuída por seringas de 1 mL (VWR 613-2041), uma para cada animal a ser inoculado, e foi acoplada uma agulha (26G × ½’’; BBraun, Sterican[®], 4665457). As seringas com a suspensão celular foram mantidas sobre gelo até serem usadas.

3.4.2. Modelo de metastização espontânea

Por definição, um modelo é uma aproximação da realidade. Já existem modelos animais de metastização espontânea desde há algumas décadas. Estes modelos são certamente mais

exigentes e complicados, mas têm como vantagem principal vantagem incluir todas as etapas da cascata de metastização (Fidler, 2006).

Apesar de as células neoplásicas formarem grandes lesões quando implantadas subcutaneamente, o crescimento num ambiente ectópico normalmente é incapaz de resultar em metastização. Assim, para produzirem metástases de forma mais eficiente, as células neoplásicas com potencial metastático, devem ser implantadas em órgãos ortotópicos, ou seja, no mesmo tecido/órgão que deu origem à linha celular neoplásica (Fidler, 2003). A inoculação de células ou fragmentos tumorais numa região adjacente ou no próprio tecido de origem, frequentemente aumenta as suas propriedades tumorigénicas e/ou malignas (Bresalier et al., 1987; Fidler et al., 1990; Fidler, 1986; R S Kerbel, Cornil, & Theodorescu, 1991; Miller, Medina, & Heppner, 1981; Naito, von Eschenbach, Giavazzi, & Fidler, 1986).

Os transplantes tumorais ortotópicos (Furukawa, Kubota, Watanabe, Kitajima, & Hoffman, 1993; Kiguchi et al., 1998; Kubota, 1994; Morikawa, Walker, Jessup, & Fidler, 1988; Price & Zhang, 1990) aumentam a probabilidade de metastização relativamente aos transplantes subcutâneos (heterotópicos) (Fidler, 2006; Killion et al., 1998), e permitem obter múltiplas metástases em estado avançado (Barnett & Eccles, 1984; Dawson, Duda, Chae, Fukumura, & Jain, 2009; Holden, Emi, Kakeji, Northey, & Teicher, 1997; Nangia-Makker et al., 2002; B A Teicher et al., 1994), especialmente se o tumor primário for removido cirurgicamente (Munoz et al., 2006).

3.4.2.1. Preparação dos murganhos para a implantação subcutânea e intradérmica

Os murganhos (da estirpe C57BL/6) foram anestesiados por administração intraperitoneal de 300 μ L (fêmeas) ou 500 μ L (machos) de uma solução de avertina a 2,5% (v/v) (anexo I). Quando os animais não apresentavam qualquer reflexo, foi realizada a tricotomia da região do flanco direito e a pele foi bem limpa com etanol a 70% (v/v).

Para os **implantes subcutâneos**, foi realizada uma prega de pele na região do flanco previamente preparada e a agulha (26G, $\frac{1}{2}$ "') foi introduzida sob essa prega. Em cada animal foram implantadas 1×10^5 células B16-F10 num volume de 100 μ L (isto é, 100 μ L de uma suspensão celular na concentração 1×10^6 /mL). A presença de uma pequena bolha subcutânea imediatamente após libertar a prega de pele serviu para confirmar a correta introdução subcutânea do inóculo. Foram realizados 7 ensaios de implantação subcutânea.

Para os **implantes intradérmicos**, foi também realizada uma prega de pele na região do flanco previamente preparada. A agulha (26G, $\frac{1}{2}$ "'), com o bisel voltado para cima, foi introduzida paralelamente à pele, visualizando à transparência a sua passagem sob as primeiras camadas da epiderme. Em cada animal foram implantadas 3×10^4 ou 5×10^4 células B16-F10 num volume

de 50 μL (isto é, de uma suspensão celular com $1 \times 10^6/\text{mL}$). A presença de uma pequena bolha de parede quase transparente, na pele, permitiu confirmar a correta introdução intradérmica do inóculo. Na implantação ortotópica o inóculo de células e também o volume da suspensão celular tem de ser menor do que na implantação subcutânea, para minimizar a lesão infligida na pele.

3.4.2.2. Monitorização do crescimento do tumor primário

Durante a primeira semana após a inoculação, os animais transplantados foram monitorizados por palpação a cada dois dias. No final da primeira semana, quando já se verificava a presença de uma massa palpável, iniciou-se a avaliação do volume tumoral. Para tal, a cada dois dias, com uma craveira, foi realizada a medição do comprimento maior (L) e do comprimento menor (W) e o volume tumoral foi calculado com base na fórmula do volume elipsoidal $L \times W^2 \times 0,52$ (Euhus, Hudd, LaRegina, & Johnson, 1986; Tomayko & Reynolds, 1989).

Esta monitorização teve apenas como objetivo definir o momento de realização da cirurgia e não o acompanhamento do crescimento do tumor primário.

3.4.2.3. Cirurgia para remoção do tumor primário

A implantação das células tumorais em tecidos ortotópicos frequentemente origina tumores muito volumosos potencialmente fatais. Apesar da disseminação das células neoplásicas a partir do tumor primário poder ocorrer numa fase muito precoce do desenvolvimento tumoral o crescimento para formar lesões distantes macroscópicas requer semanas a meses nos murganhos (Fidler, 2003). Por isso, aconselha-se a remoção cirúrgica do neoplasma primário para prolongar a sobrevivência dos murganhos por um tempo suficiente para permitir que as células neoplásicas disseminadas a partir do tumor primário, proliferem ao ponto de estabelecer macrometástases no local distante, recapitulando dessa forma os múltiplos passos sequenciais associados à cascata metastática e evitando que os murganhos morram devido ao grande volume tumoral primário (Barnett & Eccles, 1984; Cruz-Munoz, Man, Xu, & Kerbel, 2008; Fidler & Hart, 1982; Fidler, 2006; Francia et al., 2008, 2011; Munoz et al., 2006). Este é certamente o caso do melanoma murino implantado na pele ou na almofada plantar seguido de excisão cirúrgica (Fidler, 1980).

Estudos em tumores experimentais, vieram revelar que a remoção cirúrgica ou tratamento local do tumor primário, pode levar ao aumento de angiogénese nos locais distantes (Gohongi et al., 1999; Hartford, Gohongi, Fukumura, & Jain, 2000; Volpert, Lawler, & Bouck, 1998), o que pode facilitar o crescimento de micrometástases dormentes (Camphausen et al., 2001; Holmgren et al., 1995; M. O'Reilly et al., 1994; Rofstad & Graff, 2001) devido à redução dos

níveis sanguíneos de fatores anti-angiogênicos, sobretudo de TGF- β 1 (Gohongi et al., 1999), TSP-1 (Rofstad & Graff, 2001; Volpert et al., 1998), endostatina (Hartford et al., 2000) ou angiostatina (Camphausen et al., 2001; Holmgren et al., 1995; M. O'Reilly et al., 1994; Rofstad, Galappathi, & Mathiesen, 2004).

Assim, na modelação da metastização em murganhos, a remoção cirúrgica do tumor primário é duplamente vantajosa: além de permitir prolongar a sobrevivência dos animais por tempo suficiente para que se formem macrometástases facilmente detetáveis, representa também um estímulo ao desenvolvimento metastático.

Os implantes subcutâneos e intradérmicos foram removidos cirurgicamente em diferentes momentos após a implantação. No caso dos implantes subcutâneos, a cirurgia foi realizada 10 a 22 dias depois e no caso dos implantes intradérmicos a cirurgia foi realizada 11 e 15 dias depois.

Para a remoção cirúrgica dos implantes, os murganhos foram anestesiados tal como descrito em 3.4.2.1). Foi então realizada uma incisão da pele, com uma lâmina de bisturi (n.º 11, VWR 233-5474), a cerca de 5 mm da margem do tumor. Com uma pinça hemostática (Halsted-Mosquito, F.S.T[®] 13008-12) a margem de pele livre foi segura e os pequenos vasos capilares foram cauterizados com um eletrocautério. Mantendo a margem de pele livre segura pela pinça e rebatida sobre o corpo, a massa tumoral foi desbridada e separada da fáscia da parede abdominal (no caso dos implantes subcutâneos) com tesoura de pontas rombas (Metzenbaum, F.S.T[®] 14016-14); os vasos rompidos no processo foram igualmente cauterizados de modo a prevenir perdas de sangue e, acima de tudo, prevenir a entrada de células neoplásicas na circulação. Durante este processo foi tido o cuidado de não atingir a massa tumoral, mantendo uma margem com cerca de 5 mm. Tanto no caso dos implantes subcutâneos como no caso dos implantes intradérmicos, além do tumor, foi também removida a pele sobre a massa tumoral, por corte com tesoura cirúrgica (Tungsten-Carbide Iris, F.S.T[®] 14558-09). Antes de encerrar a pele e a parede abdominal, toda a área em redor foi limpa com etanol a 70% para matar quaisquer células tumorais que pudessem ter sido libertadas durante a cirurgia. A incisão da pele foi finalmente fechada realizando uma sutura descontínua de pontos simples com fio de seda (4/0; Aesculap[®], B-Braun, Silkam[®], C0765201). Seguidamente foi administrado cerca de 400 μ L de soro salino (NaCl 0,9%) aquecido por via subcutânea no dorso para permitir uma melhor recuperação dos murganhos.

3.4.3. Modelo de metastização experimental

Uma das vias mais importantes para a disseminação de tumores malignos é o sistema circulatório. Após invadir um tecido local e entrar na circulação sanguínea, as células neoplásicas podem estabelecer-se em diversos órgãos de acordo com diversos fatores. Um deles é a barreira física que a primeira cama capilar encontrada representa (Fidler & Nicolson, 1976; Fisher & Fisher, 1967; Zeidman, 1961).

Apesar de a maioria das linhas celulares neoplásicas serem isoladas de metástases de pacientes humanos, raramente conseguem disseminar-se para órgãos distantes, a partir do local onde são implantadas nos murganhos. Por isso, os modelos murinos de metastização mais amplamente utilizados baseiam-se na introdução das células neoplásicas diretamente na circulação sistêmica (por via da veia lateral da cauda, da veia porta, ou intracardiaca) para estabelecer metástases em órgãos distantes. Esta abordagem não permite avaliar as etapas iniciais da cascata de metastização e não mimetiza a libertação faseada e prolongada de células neoplásicas na circulação sanguínea pelo tumor primário que ocorre na doença natural, mas permite estudar alguns fatores relacionados com a colonização (Jing Yang, Mani, & Weinberg, 2006).

3.4.3.1. Genotipagens para $Dll4^{lox/wt}$ e para $VE-cadherin-Cre-ER^{T2}$

Para avaliar a presença da mutação $Dll4^{lox/wt}$, foi realizada o PCR $Dll4^{lox}$ (anexo IV). Utilizando como molde o ADN extraído das caudas dos descendentes do cruzamento referido em 3.2.5., esta reação permite a formação de dois produtos distintos: um com 455 pb, correspondente ao alelo $Dll4$ flanqueado por $loxP$ ($Dll4^{lox}$), e um com 419 pb, correspondente ao alelo $Dll4$ sem locais $loxP$ ($Dll4^{wt}$). Foram selecionados e utilizados apenas os animais descendentes com um dos alelos $Dll4$ flanqueado por locais $loxP$ ($Dll4^{lox/wt}$).

Os animais $Dll4^{lox/wt}$ foram ainda avaliados para a presença da mutação $VE-cadherin-Cre-ER^{T2}$ realizando o PCR VECad-Cre (anexo IV). Utilizando como molde o ADN extraído das caudas dos descendentes do cruzamento referido em 3.2.5., esta reação permite a formação, ou não, de um produto com 350 pb, correspondente à presença do gene que codifica a recombinase Cre. As sequências oligonucleotídicas iniciadoras utilizadas em ambas as reações encontram-se no anexo IV.

Os produtos das reações acima descritas foram depois sujeitos a eletroforese em gel de agarose.

3.4.3.2. Administração de tamoxifeno

Para os ensaios de metastização experimental, quando alcançaram 8 semanas de idade, os 22 murganhos transgênicos $Dll4^{lox/wt} - VE-cadherin-Cre-ER^{T2}$ foram separados e pesados tendo-se verificado um peso vivo médio de 18-20 g nas fêmeas e de 20-23 g nos machos. Duas semanas

antes dos ensaios, a todos os animais (Cre + e Cre -) foi administrado 100 µL de uma solução de tamoxifeno (10 mg/mL) (anexo I), por via intraperitoneal, com seringa de 1 mL e agulha de 21G×1¹/₂", uma vez por dia, à mesma hora, durante cinco dias consecutivos. Após este período esperou-se uma semana, para garantir a ação da enzima Cre e a total eliminação do tamoxifeno do organismo, antes de serem realizados os ensaios de metastização experimental.

3.4.3.3. Preparação dos murganhos para administração endovenosa

Um a um, os murganhos foram introduzidos no interior de um tubo de centrífuga de 50 mL (VWR 525-0158) perfurado. De seguida, a cauda foi passada por um orifício criado no centro da tampa do tubo e esta foi enroscada de modo a manter o murganho contido no seu interior com a cauda de fora.

Mantendo a base da cauda segura entre o polegar e o indicador, esta foi submersa em água quente (aproximadamente 40°C) durante 1 minuto de modo a promover a vasodilatação.

3.4.3.4. Administração endovenosa na veia lateral da cauda

Com a cauda segura entre o polegar e o indicador, esta foi seca com toalhas de papel e desinfetada a região a inocular com uma pequena bola de algodão embebida em etanol a 70% (v/v).

De seguida fez-se uma ligeira rotação para expor uma das veias laterais da cauda (existem duas, uma de cada lado) e pressionou-se com o polegar para dilatar ainda mais a veia distalmente ao ponto de pressão. Mantendo o garrote, com a outra mão, a agulha (acoplada à seringa preparada tal como descrito em 3.4.1.2.), com o bisel voltado para cima, foi introduzida quase paralelamente à superfície da cauda e depois de vencer a resistência da pele, a suspensão celular foi inoculada lentamente durante 5 a 10 segundos (uma vez que esta se encontra fria, caso fosse inoculada muito rapidamente poderia causar um choque térmico). A ausência de resistência durante este processo indica que a agulha está no interior da veia; além disso, é possível observar o vaso a ficar mais claro enquanto a suspensão celular era inoculada (quando a agulha não entra na veia, o tecido muscular da cauda oferece muita resistência quando se carrega no êmbolo da seringa).

Depois de inocular a suspensão celular, a agulha foi removida lentamente para minimizar o refluxo e a saída de suspensão celular pela perfuração criada na pele da cauda. Imediatamente de seguida, o murganho foi removido do interior do tubo de contenção e deixado livre (com vigilância) sobre a caixa para poder recuperar.

3.4.4. Recolha dos pulmões e linfonodos

Os murganhos usados em ambos os ensaios de metastização (espontânea e experimental) foram sacrificados por deslocamento cervical.

Os pulmões foram recolhidos e lavados em PBS frio numa placa de Petri. Anatomicamente, os ratinhos apresentam um pulmão esquerdo e um pulmão direito dividido em 4 lobos: cranial, médio, caudal e pós-caval (ou acessório). Para preservação, os pulmões foram instilados/insuflados por injeção na traqueia de uma solução de 4% (p/v) paraformaldeído (Sigma-Aldrich, P6148) em PBS.

No caso dos murganhos usados nos ensaios de metastização espontânea foram também recolhidos os linfonodos mediastínicos e axilar e inguinal direitos. Os linfonodos foram também preservados numa solução de 4% (p/v) paraformaldeído (Sigma-Aldrich, P6148) em PBS, até observação.

3.4.4.1. Contagem do número de focos metastáticos

As colónias metastáticas de melanoma apresentam uma coloração negra bastante distinta da coloração do parênquima pulmonar ou dos linfonodos, sendo por isso facilmente identificáveis quando atingem uma dimensão macroscópica ($> 0,5$ mm diâmetro) (apesar de, por definição, uma macrometástase ser uma metástase de dimensão superior a 2 mm diâmetro, consideramos que é perfeitamente possível observar na lupa metástases com 0,5 mm). Além disso, no caso dos pulmões, a maior parte localiza-se superficialmente na pleura, sendo possível contá-las sem dissecar o pulmão em vários fragmentos. Contudo, quando existiam muitas colónias, para facilitar a contagem, os lobos do pulmão direito foram separados e observados individualmente. No caso dos pulmões recolhidos dos animais usados em ensaios de metastização experimental, as colónias metastáticas foram enumeradas observando os pulmões sob uma lupa de disseção. Foram consideradas colónias metastáticas as estruturas circulares de cor negra na superfície do pulmão e que se apresentavam suficientemente separadas para ser contatadas individualmente. No caso dos pulmões e dos linfonodos recolhidos dos animais usados nos ensaios de metastização espontânea, apenas foi anotado se existiam ou não metástases.

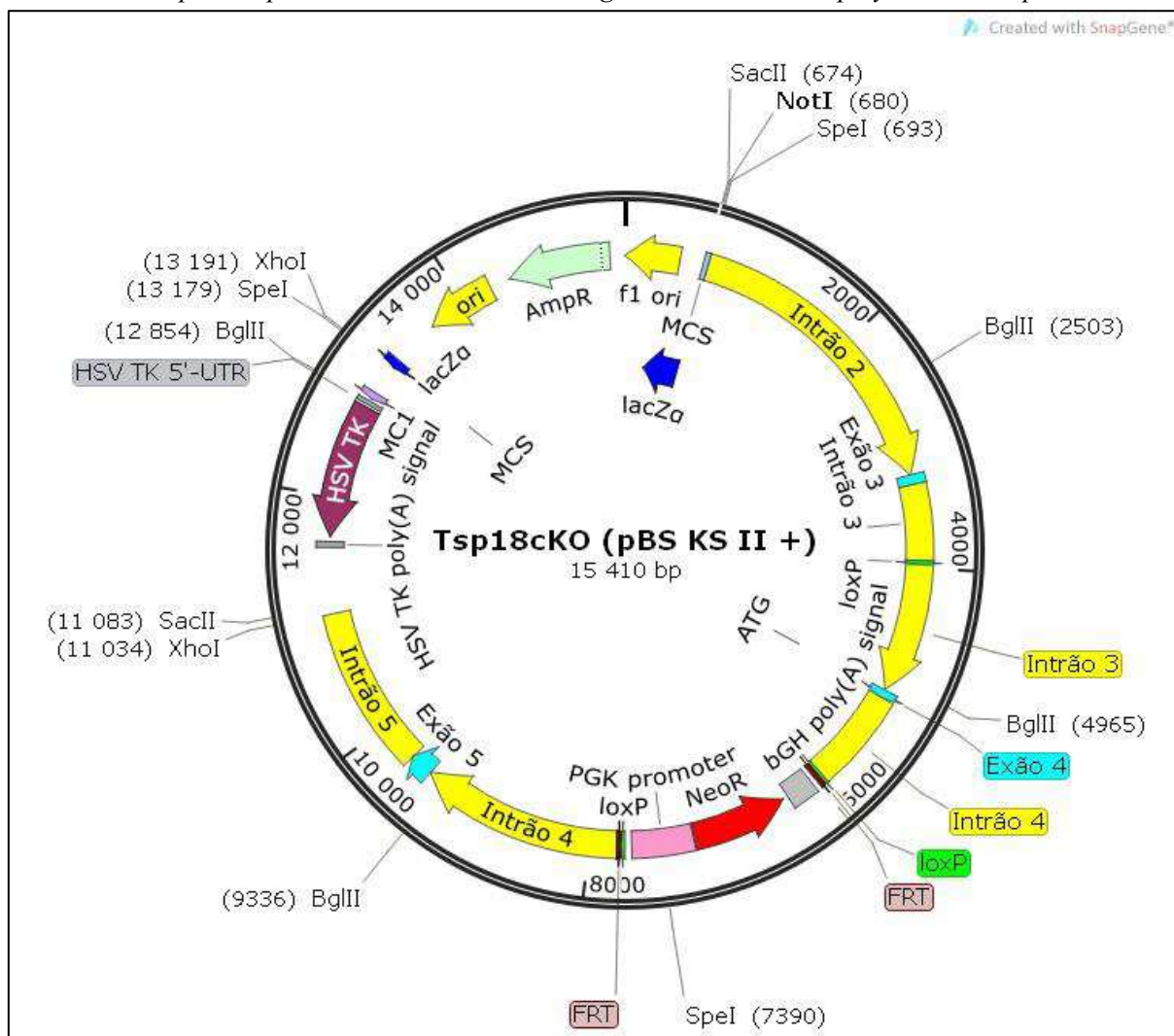
3.5. Procedimentos e reagentes específicos do trabalho experimental III

3.5.1. Vetor Tspan18cKO

O plasmídeo base da construção do vetor Tspan18cKO (*Tetraspanin18 conditional KnockOut*) foi o pBluescript II KS(+) (Figura 14) com algumas modificações do local de clonagem múltipla (MCS – *Multiple Cloning Site*), nomeadamente, a montante do *insert* apresenta os locais de restrição para as endonucleases *SacI*, *BstXI*, *SacII*, *NotI*, *EagI*, *XbaI*, *SpeI* e a jusante, os locais de restrição para as endonucleases *PmeI*, *XhoI*, *ApaI* e *KpnI*.

De acordo com os dados fornecidos juntamente com o vetor, no sentido 5' - 3', foi clonado um braço esquerdo de homologia, com cerca de 5,2 Kb (kilo pares de bases), que consiste na sequência genómica do gene murino *tspan18* (NC_000068.7, bases 93227109 a 93221912) que compreende o final do intrão 2, o exão 3, o intrão 3, interrompido por uma sequência *loxP*, o exão 4 (onde se localiza o codão de iniciação) e as primeiras 800 pb (pares de bases) do intrão 4. A seguir a este braço de homologia foi clonado um segundo local *loxP*, um local FRT, seguidos de um sinal de poliadenilação do gene da hormona de crescimento bovina (bGH poly(a)), um gene de resistência à neomicina (*NeoR*), que codifica uma enzima responsável pela fosforilação deste antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos, inativando-o (a neomicina é tóxica para os ribossomas; as células eucariotas são sensíveis a um análogo da neomicina, o G418, que é também inativado pelo produto do gene *NeoR*; assim, a inclusão do gene *NeoR* no vetor funciona como reporter da sua integração no ADN genómico das células estaminais embrionárias) e o promotor eucariota PGK (*mouse phosphoglycerate kinase 1*) que no seu conjunto constituem a doravante denominada cassette de seleção positiva; imediatamente a jusante foi clonado um terceiro local *loxP* e um segundo local FRT. O braço direito de homologia corresponde a um fragmento com cerca de 3,3 Kb da sequência genómica referência do gene murino *tspan18* (NC_000068.7, bases 93221911 a 93218638) e que compreende a restante sequência do intrão 4, o exão 5 e parte do intrão 5. Estes dois braços de homologia permitirão introduzir as alterações descritas especificamente no gene *tspan18* por recombinação homóloga (Capecchi, 1989). No local de restrição *XhoI* do MCS de pBSII KS+ foi clonada uma sequência que codifica para a Timidina Kinase (TK) do HSV (*Herpes Simplex Virus*) juntamente com o seu promotor (MC1 – *Mutant polyoma HSVtk promoter*) e o respetivo sinal de poliadenilação (*HSV TK poly (A)*); estes três elementos constituem a doravante denominada cassette de seleção negativa.

Figura 14 - Representação esquemática do vetor Tspan18cKO. A enzima de restrição *NotI* permite a linearização do vetor. AmpR – *Ampicilin Resistance – beta-lactamase gene*. MCS – *Multiple Cloning Site*. lacZα – gene para a beta-galactosidase. ori – *origin of replication*. loxP – *locus of X-over P1*. FRT – *flippase recognition target*. bGH poly(A) – *bovine Growth Hormone gene polyadenilation signal*. NeoR – gene da fosfotransferase da neomicina. PGK – *mouse phosphoglycerate kinase 1 promoter*. HSV TK – *Herpes Simplex Virus Thimidine Kinase gene*. MC1 – *Mutant polyoma HSVtk promoter*.



Assim, caso ocorra integração aleatória no ADN genómico murino, a sequência que codifica a TK do HSV não é perdida e as CEEs morrem por sensibilidade ao Ganciclovir (Figura 15A). Caso a integração seja por recombinação homóloga no gene *tspan18*, é perdida a cassette de seleção negativa e as CEEs resistem ao Ganciclovir (Figura 15B) (Capecchi, 1989; Mansour, Thomas, & Capecchi, 1988; K. R. Thomas & Capecchi, 1987).

Figura 15 - Representação esquemática do vetor Tspan18cKO linearizado e integrado aleatoriamente (A) ou por recombinação homóloga (B) no ADN genómico (barra azul).

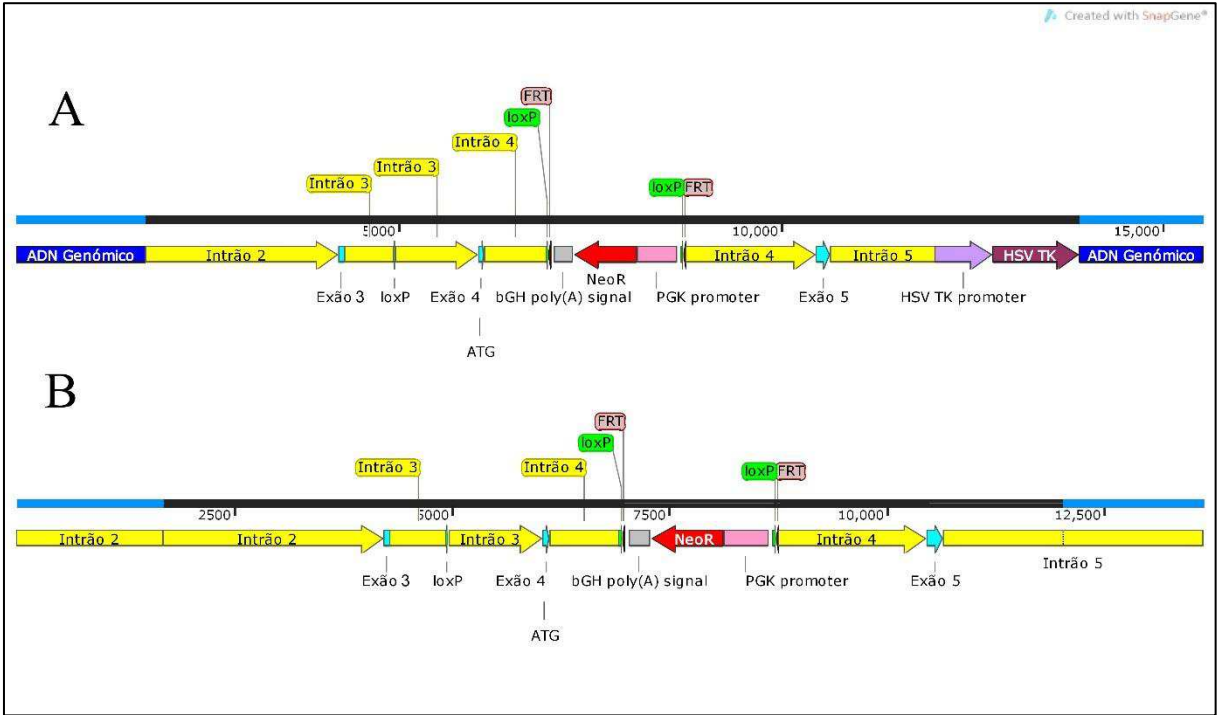


Figura 16 - Representação esquemática da integração do vetor Tspan18cKO por recombinação homóloga no ADN genómico (A), da excisão da sequência entre locais FRT após expressão da recombinase Fip (B) e da subsequente excisão da sequência entre o 1º e 2º locais *loxP* por indução da expressão da recombinase Cre (C).

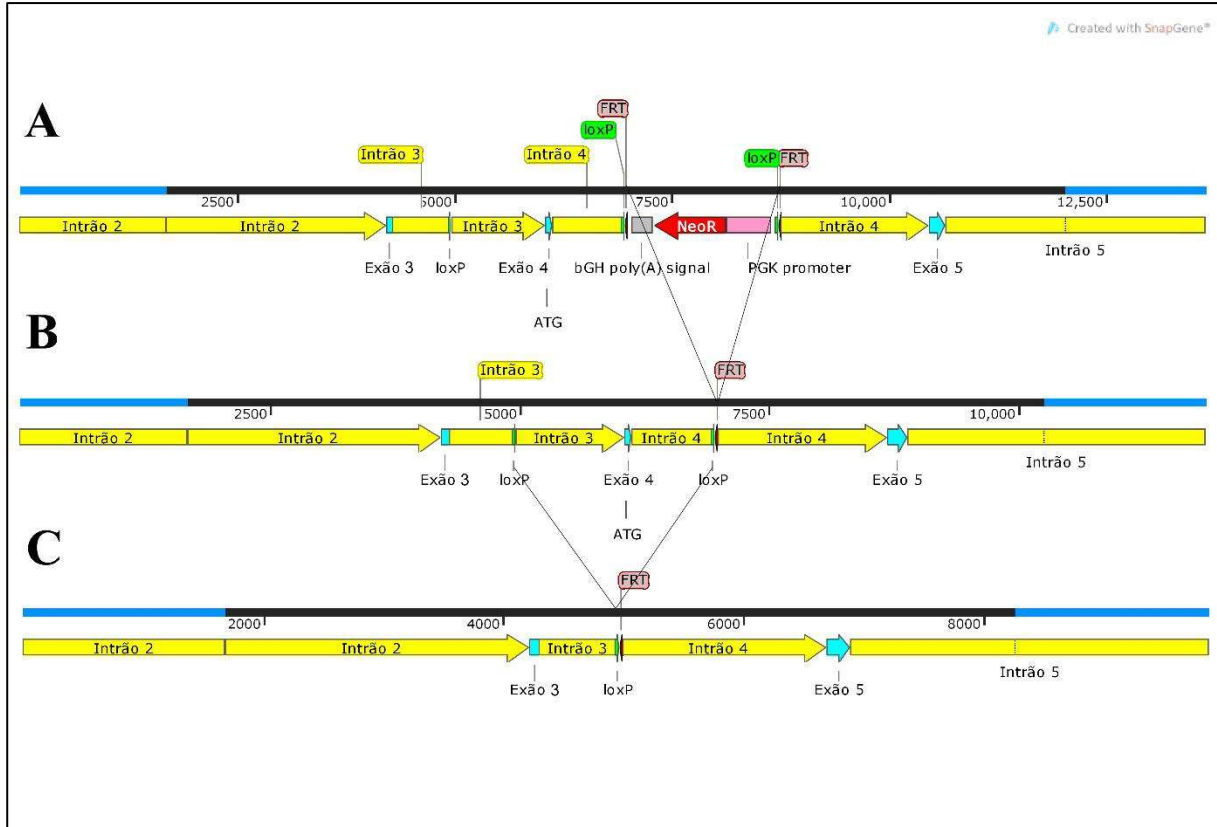
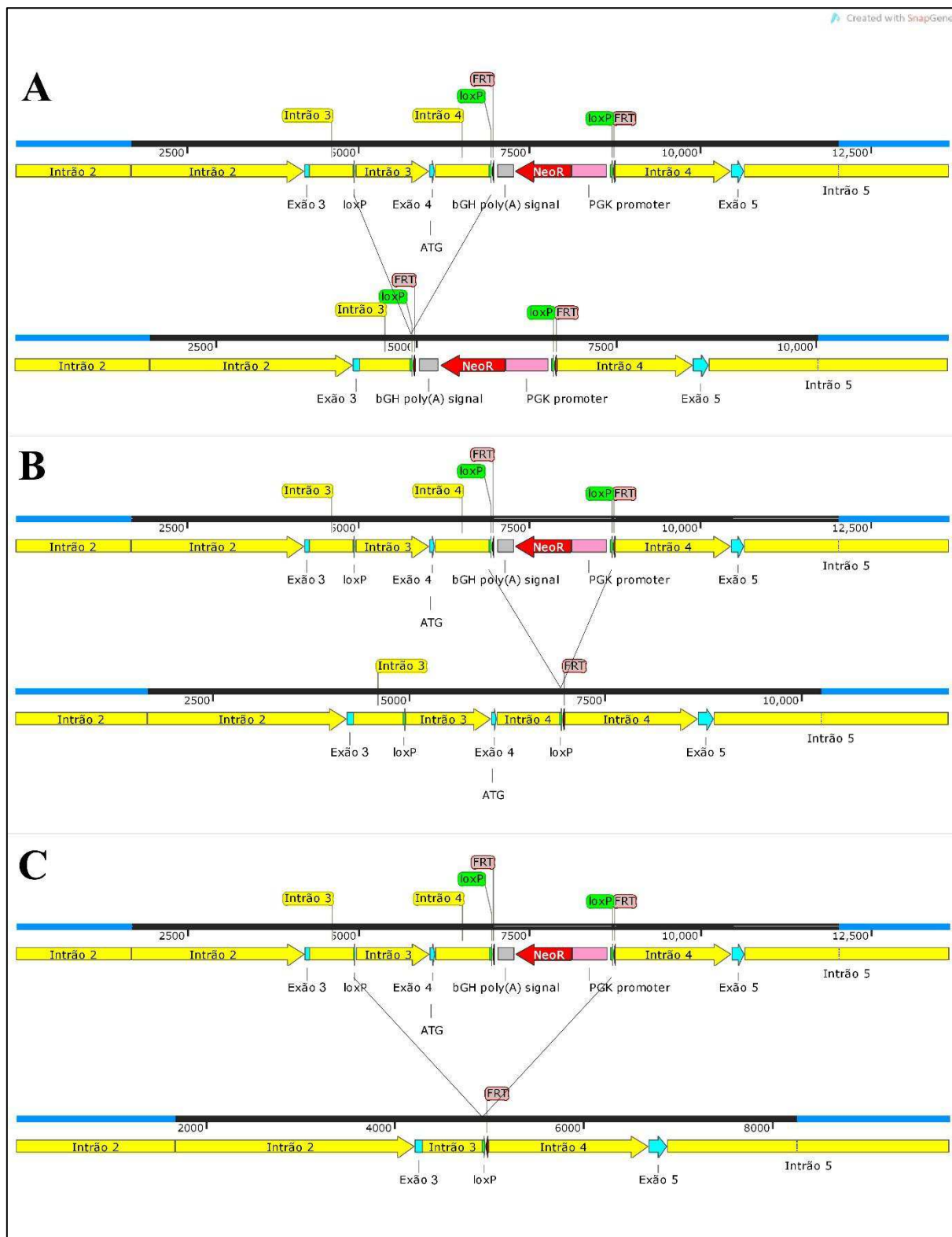


Figura 17 - Representação esquemática da integração do vetor Tspan18cKO por recombinação homóloga no ADN genómico e da subsequente excisão da sequência entre o 1º e 2º locais *loxP* (A), entre o 2º e o 3º locais *loxP* (B) ou entre o 1º e o 3º locais *loxP* (C) por indução da expressão da recombinase Cre.



Por expressão da recombinase Flp ocorrerá recombinação entre os locais FRT, conduzindo à deleção de um fragmento com cerca de 1,77 Kb que inclui a cassette de seleção negativa e o 3º

local *loxP* (Figura 16A, B) (Dymecki, 1996). A subsequente indução da expressão da recombinase Cre conduzirá à excisão do fragmento com cerca de 2 Kb entre o 1º e 2º local *loxP*, no intrão 3 e no exão 4, respetivamente, eliminando assim as primeiras 63 pb codificantes do gene *tspan18* (Figura 16C) (B. Sauer & Henderson, 1988).

Caso não se remova o fragmento correspondente à fosfotransferase da neomicina, por expressão da recombinase Flp, poderá ocorrer igualmente recombinação entre o 1º e o 2º local *loxP* (Figura 17A), entre o 1º e o 3º local *loxP* eliminando assim um fragmento com cerca de 3,7 Kb (Figura 17B) (que inclui o exão 4 com o codão ATG, o 2º local *loxP*, o 1º local FRT, o sinal poly(A) e a cassette de resistência à neomicina), ou entre o 2º e o 3º local *loxP*, eliminando um fragmento com cerca de 1,8 Kb que não engloba o codão de iniciação do exão 4 (Figura 17C). O vetor Tspan18cKO foi gentilmente cedido pelo laboratório do Dr. Parkash S.Gill.

3.5.1.1. Transformação de células competentes

O vetor Tspan18cKO foi recebido na forma desidratada num pedaço de papel Whatman 3MM (Whatman®, 3030-861). Para o recuperar, o referido pedaço de papel foi colocado no interior de um microtubo de polipropileno (*ependorf*) de 1,5 mL, coberto com 20 µL de água destilada livre de nucleases (Sigma-aldrich®, W4502) e incubado durante a noite a 4°C.

De modo a amplificar a quantidade de ADN plasmídico, foi necessário transformar bactérias competentes *Escherichia coli* estirpe M.O.S (gentilmente cedidas pelo laboratório de Nutrição Animal e Biotecnologia do CIISA). Para tal, foi realizado um protocolo que tem por base método de Hanahan, com pequenas modificações (Sambrook & Russell, 2001a).

Uma alíquota de 200 µL de células competentes foi descongelada sobre gelo durante cerca de 15 minutos. Após este tempo, à chama, foi adicionado 2 µL do plasmídeo reconstituído e procedeu-se à homogeneização invertendo o microtubo 6-7 vezes. De seguida colocou-se o microtubo sobre gelo durante 30 minutos. Posteriormente o choque térmico foi realizado submergindo o microtubo no banho maria a 42°C durante 45 segundos e de seguida sobre gelo durante 5 minutos. Após a adição de 800 µL de meio de cultura LB líquido estéril (anexo II), à chama, as células competentes recuperaram por incubação durante uma hora a 37°C e a 200 rpm na incubadora orbital Gallenkamp. Após a incubação, 50 µL da cultura de células competentes foram espalhados com uma ansa de vidro sobre placa de LB agar com ampicilina (anexo II), e a placa invertida foi incubada na estufa 37°C durante a noite. No dia seguinte, com ansas descartáveis de ponta destacável (Sarstedt, 86.1567.051), foram picadas 10 colónias isoladas e realizado um riscado para cada uma em placa de LB agar com ampicilina. A placa foi incubada na estufa a 37°C durante a noite. A parte destacável de cada ansa foi transferida

para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade, com 3 mL de meio LB líquido adicionado de 3 µL de solução *stock* de ampicilina (anexo I) (concentração final de 100 µg ampicilina/mL meio cultura) e incubada a 37°C com agitação (200 rpm) na incubadora orbital Gallenkamp durante a noite. Quando era necessário preservar um clone específico, no dia seguinte foram retirados 700 µL da cultura em suspensão para um criotubo de 2 mL (Thermo Scientific™ Nunc™, 368632), adicionados 300 µL de glicerol a 50% (anexo I) e após homogeneização por 7-8 inversões do criotubo fechado, este foi guardado a -80°C.

3.5.1.2. Amplificação e extração de ADN plasmídico em pequena escala

Foi feita de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial de extração e purificação de ADN (QIAprep® Spin Miniprep, QIAGEN® 27104) e que se baseia no protocolo originalmente descrito por Bimboim e Doly (Bimboim & Doly, 1979).

Recolheu-se 1,5 mL de cultura e centrifuga-se 1 minuto a 13000 rpm numa microcentrífuga de bancada. Repetiu-se este passo até esgotar toda a cultura em suspensão, eliminando o sobrenadante, por decantação, entre centrifugações. Após remover muito bem qualquer vestígio de meio de cultura, o precipitado de células foi ressuspensão na solução de suspensão (que contém ARNase para evitar a contaminação da solução final por ARN) por agitação vigorosa no *vortex*. De seguida procedeu-se à lise alcalina das bactérias adicionando uma solução de hidróxido de sódio com SDS. O SDS presente na solução de lise solubiliza os componentes proteicos e fosfolipídicos da membrana celular conduzindo à lise e libertação dos conteúdos celulares e as condições alcalinas permitem a desnaturação do ADN cromossómico e plasmídico, assim como das endonucleases e outras proteínas em suspensão.

O lisado alcalino é posteriormente neutralizado com um tampão de alto conteúdo salino (hidroclorato de guanidínio a 4,2 M e acetato de potássio a 0,9 M) e pH ácido (4,8). O passo de neutralização conduz à precipitação do ADN cromossómico, dos detritos celulares e das proteínas desnaturadas com o SDS e os sais, mantendo o ADN plasmídico em solução. A centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto permite depois separar estas duas fases. A fase solúvel é carregada na coluna com uma membrana de sílica-gel que se liga ao ADN plasmídico com elevada afinidade em condições de elevadas concentrações de sais. Endonucleases que ainda possam estar presentes, são eficientemente removidas na primeira lavagem.

As proteínas e metabolitos eventualmente remanescentes são removidos nas lavagens subsequentes da coluna. No final o ADN é eluído quando se faz passar uma solução de baixa força iónica (água livre de nucleases ou uma solução de Tris-Cl a 10 mM com pH 8,5) pela mesma. O ADN obtido por este método foi usado para digestões de diagnóstico e para transformar uma estirpe bacteriana que expressa a recombinase Cre.

3.5.1.3. Extração de ADN plasmídico em grande escala

Foi feita de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial de extração e purificação de ADN (QIAGEN® Plasmid Maxi Kit, 12163). Este protocolo baseia-se numa lise alcalina modificada seguida da ligação do ADN plasmídico à resina da coluna (fornecida pelo fabricante) sob condições de baixa concentração de sais e pH. ARN, proteínas e outros contaminantes de baixo peso molecular são depois removidos por lavagens com concentrações moderadas de sais. No final, o ADN plasmídico é eluído num tampão de elevada concentração salina e depois concentrado e lavado de sais por precipitação com isopropanol.

A partir de um riscado fresco foi picada uma colónia para 3 mL de meio LB suplementado com ampicilina (na concentração final de 100 µg/µL), num tubo de polipropileno estéril com capacidade de 15 mL. Esta cultura *starter* foi incubada com agitação (300 rpm) a 37°C durante 8 horas. No final deste tempo, 200 µL da cultura *starter* foram inoculados em 500 mL de meio LB suplementado com ampicilina (na concentração final de 100 µg/mL), num *Erlenmeyer* com 2 L de capacidade (para assegurar o arejamento da cultura) e incubados a 37°C durante cerca de 16 horas com agitação (200 rpm) na incubadora orbital Gallemkamp. Normalmente tentou-se assegurar que o tempo de crescimento não ultrapassasse as 16 horas para evitar a ocorrência de autólise durante a fase estacionária de crescimento, o que tem como consequência a contaminação do ADN plasmídico com ADN genómico bacteriano.

No final do tempo de incubação, a cultura foi transferida para copos de centrífuga de polipropileno (Nalgene® style 3120, Sigma-Aldrich B1033) e centrifugada a 6000 ×g durante 15 minutos a 4°C na ultracentrífuga (Beckman Coulter Avanti® J-26XPI).

O precipitado celular, livre de vestígios de meio de cultura, foi ressuspensado por pipetagem em 20 mL de uma solução de ressuspensão (50 mM TrisCl, 10 mM EDTA; pH 8,0) com ARNase (100 µg/mL). As células ressuspensas foram divididas por dois tubos de ultracentrífuga (Thermo Scientific™ Nalgene™, 3114-0030). A adição de 10 mL de solução de lise (200 mM NaOH, 1% SDS) à suspensão celular de cada tubo, homogeneização (por 4-6 inversões do tubo selado) e incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos, permitiu a lise alcalina das células bacterianas.

A neutralização do lisado foi feita adicionando 10 mL de solução de neutralização (acetato potássio 3 M, pH 5,5) pré-arrefecido, homogeneizando imediatamente por 4-6 inversões do tubo devidamente selado e incubando durante 20 minutos sobre gelo. Após a adição do tampão de neutralização observou-se a formação de um material esponjoso e branco, que corresponde ao ADN genómico, proteínas, detritos celulares e KDS (dodecil sulfato potássio) precipitados. A incubação sobre gelo e a adição do tampão de neutralização pré-arrefecido favorece o processo de precipitação.

Após uma centrifugação ($20000 \times g$, 30 minutos a 4°C) o sobrenadante límpido com o ADN plasmídico em solução, separado do material precipitado, foi transferido para tubos de ultracentrífuga (Thermo Scientific™ Nalgene™, 3114-0030) limpos e sujeito a nova centrifugação ($20000 \times g$, 15 minutos a 4°C) para eliminar eventuais resíduos de material precipitado.

O sobrenadante com o ADN plasmídico em suspensão foi posteriormente aplicado à coluna pré-equilibrada, fornecida pelo *kit*. Por gravidade todo o sobrenadante passa pela coluna de resina aniônica e o ADN plasmídico foi adsorvido pela mesma (por interação entre as cargas negativas dos grupos fosfato do ADN e as cargas positivas da resina) em condições de baixa concentração salina. Esta ligação é influenciada pela temperatura, concentração de sais e pH das soluções.

Em seguida, a lavagem da coluna em condições de concentração moderada de sais (1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% (v/v) isopropanol), eliminou o ARN, proteínas, glicídios e outras impurezas.

O ADN plasmídico foi eluído em condições de elevada concentração de sais (1,25 M NaCl, 50mM Tris-Cl, pH 8,5, 15% (v/v) isopropanol) para tubos de vidro (Kimble HS No 45500-30), concentrado e precipitado por isopropanol (Sigma-aldrich®, I9516) e por fim, lavado dos sais com etanol (Merck Millipore®, 100983) a 70% (v/v). O precipitado de ADN plasmídico foi seco ao ar durante 5 a 10 minutos e ressuspensão num volume adequado (100 – 200 μL) de água destilada livre de nucleases (Sigma-aldrich®, W4502) por agitação ligeira num *vortex*.

A concentração do ADN plasmídico foi avaliada através da leitura dos valores de absorvância a 260 nm e 280 nm por espectrofotometria (Thermoscientific™ NanoDrop 2000c) e calculada com base na seguinte relação: 1 unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 50 μg de ADN em dupla cadeia por mL de solução. No caso de ADN em dupla cadeia, a razão A_{260}/A_{280} no valor de pelo menos 1,8, indica uma eficaz remoção de contaminantes (sais e proteínas) durante o processo de purificação.

3.5.1.4. Digestões de diagnóstico com endonucleases de restrição

De acordo com o mapa de restrição do vetor Tspan18cKO (Figura 14), a enzima *NotI* (NEB®, R0189S) tem apenas um local de reconhecimento pelo que, a digestão do vetor circular com esta endonuclease de restrição, deverá produzir apenas um fragmento com 15410 pb. As enzimas *SacII* e *XhoI* apresentam dois locais de reconhecimento. Assim, a digestão do vetor circular por estas enzimas, separadamente, deverá produzir dois fragmentos de 5001 pb e 10409 pb no caso de *SacII* (Takara, 1079A), e de 2157 pb e 13253 pb no caso de *XhoI* (Takara, 1094A). A enzima *SpeI* (NEB, R0133S) apresenta 3 locais de reconhecimento, pelo que a digestão do

vetor circular com esta endonuclease de restrição, deverá produzir 3 fragmentos: 2924 pb, 5789 pb e 6697 pb. A enzima *BglIII* (Promega, R6085) apresenta 4 locais de reconhecimento, pelo que a digestão do vetor circular com esta endonuclease de restrição, deverá produzir 4 fragmentos: 2462 pb, 3518 pb, 4371 pb e 5059 pb.

A quantidade de enzima usada depende da quantidade de ADN que se pretende digerir. Regra geral foram utilizadas 10 U de enzima de restrição por cada 1 µg de ADN a digerir, segundo indicações do fabricante. Tal foi necessário para garantir que a restrição decorria normalmente. Menores quantidades de enzima levavam demasiado tempo a digerir completamente a amostra. Sabendo que a mistura de digestão não pode ter mais do que 10% em solução da enzima de restrição, determinou-se então qual o volume final da mistura de digestão. Adicionou-se 1/10 desse volume em tampão de restrição 10× concentrado (específico da enzima), segundo indicação do fabricante. O resto do volume foi completado por adição de água desionizada. A reação de restrição decorreu em manta de aquecimento (Grant type JB1) à temperatura recomendada para cada enzima. As sequências de reconhecimento de cada endonuclease de restrição encontram-se no anexo VI.

Para avaliar o tamanho dos fragmentos resultantes das restrições enzimáticas, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 0,8%, tal como descrito em 3.6.2. Antes da aplicação no gel, a cada amostra foi adicionado 1/6 do volume total em tampão de amostra 6× concentrado (anexo I), que contém glucose para aumentar a densidade da amostra (evitando que esta saia do poço) e laranja G. O laranja G é um corante azo que é usado sobretudo para seguir a migração de amostras de ADN em géis de agarose. Normalmente corre nos géis na zona dos fragmentos com 50 pb, não interferindo assim com a visualização de fragmentos maiores.

3.5.1.5. Sequenciação

De modo a confirmar a presença de todas as mutações que são necessárias introduzir no genoma murino, o vetor Tspan18cKO foi enviado para os serviços da StabVida, Lda. para sequenciação. Uma vez que se trata de um vetor muito extenso, tornando dispendiosa a sua sequenciação completa, decidimos desenhar 4 oligonucleótidos iniciadores (*primers*) imediatamente a montante dos locais de interesse. O desenho de todos os oligonucleótidos iniciadores foi feito com recurso ao programa Primer3 v.0.4.0 (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser et al., 2012). As sequências dos oligonucleótidos iniciadores encontram-se no anexo V. O primeiro *primer* (I3prelox) hibrida 200 pb a montante do primeiro local *loxP* no intrão 3. O segundo *primer* (I3preE4) hibrida 100 pb a montante do exão 4 e permite-nos confirmar a presença do codão ATG no exão 4. O terceiro *primer* (I4prelox2) hibrida 100 pb a montante do segundo local *loxP*,

no intrão 4, permitindo-nos confirmar a presença e orientação deste segundo *loxP* assim como a presença do primeiro local FRT. O quarto *primer* (Neo) hibrida na cassete de seleção negativa, cerca de 150 pb a montante do segundo local FRT e permite-nos confirmar a presença deste e do terceiro local *loxP*.

Além da sequenciação a partir destes 4 *primers*, pedimos ainda a sequenciação dada a partir dos *primers* universais M13FW e M13REV que se ligam nas respectivas extremidades do MCS do vetor *pBluescript*.

Todas as regiões sequenciadas foram analisadas no programa BLAST® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschup, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990) para nucleótidos com o algoritmo “blastn” em que se pediu para alinhar duas ou mais sequências, neste caso alinharam-se as sequências devolvidas pelo serviço de sequenciação com a sequência prevista para a mesma região do braço de homologia.

3.5.1.6. Testagem da funcionalidade dos locais *loxP*

Apesar de termos informação sobre a sequência do vetor Tspan18cKO e consequentemente sobre a orientação dos locais *loxP*, era importante confirmar a funcionalidade destes locais para garantir que este vetor nos iria permitir a deleção da região do ADN que inclui o codão de iniciação para a Tetraspanin 18.

3.5.1.6.1. Produção de bactérias *Escherichia coli* BNN132 competentes

A estirpe BNN132 deriva da estirpe JM107 que foi transformada com um plasmídeo recombinante que inclui o gene *Cre* e um gene que codifica um produto que confere resistência ao antibiótico canamicina (Elledge, Mulligan, Ramer, Spottswood, & Davis, 1991). Esta estirpe foi-nos enviada pelo Dr. Richard Behringer do M. D. Anderson Cancer Centre da Universidade do Texas.

Para a produção de um lote de células competentes desta estirpe bacteriana, foi seguido um protocolo adaptado do método de Hanahan (Sambrook & Russell, 2001a).

3.5.1.6.2. Transformação de bactérias *E. coli* BNN132 competentes

Após descongelação sobre gelo de uma das alíquotas de bactérias *E. coli* BNN132 competentes, procedeu-se à transformação de 100 µl da suspensão de células competentes com 1 µL do vetor Tspan18cKO reconstituído, de acordo com o método descrito em 3.5.1.1. As células foram plaqueadas em LB-agar com ampicilina.

3.5.1.6.3. Amplificação e extração em pequena escala do ADN plasmídico recombinado

Foi feita a amplificação e extração do ADN plasmídico potencialmente recombinado de 10 colónias, picadas das placas de LB-agar com ampicilina, semeadas com as células competentes BNN 132 transformadas com o vetor Tspan18cKO, de acordo com o método descrito em 3.5.1.2 com as seguintes modificações: as culturas foram crescidas durante aproximadamente 18 horas a 16°C, com agitação (200 rpm), para permitir a expressão da recombinase Cre e a recombinação entre locais *loxP*.

3.5.1.6.4. Linearização com endonuclease de restrição

Para determinar se houve ou não recombinação entre os locais *loxP*, e consequentemente concluir a funcionalidade destes locais no vetor, foi necessário comparar o tamanho do vetor Tspan18cKO com o tamanho deste mesmo vetor amplificado e extraído das células BNN132. Como habitualmente os vetores plasmídicos se encontram nas células hospedeiras em diversas conformações (circular relaxado, linear, superenrolado, superenrolado desnaturado), que migram com diferentes velocidades no gel de agarose apesar de terem o mesmo tamanho, tornou-se necessário realizar a sua linearização e comparar o seu padrão de migração com o do vetor Tspan18cKO amplificado e extraído de *E. coli* M.O.S, linearizado também.

Após extração de ADN plasmídico das 10 colónias selecionadas de *E. coli* BNN 132, realizou-se a sua linearização com a endonuclease de restrição *NotI* (NEB®, R0189S). Para tal, a 250 ng de ADN plasmídico extraído de cada colónia, foram adicionadas 5 U de enzima, 1/10 do volume final em tampão de reação específico da enzima, 1/100 de BSA (*Bovine Serum Albumin*) e água destilada livre de nucleases até completar um volume final de 30 µL. As reações foram incubadas durante 4 horas a 37 °C em manta de aquecimento.

3.5.1.6.5. Electroforese em gel de agarose e confirmação da funcionalidade dos locais *loxP*

Foi realizada de acordo com o método descrito em 3.6.2.

Após linearização do vetor extraído das células BNN132, parte do produto da reação foi adicionado de tampão de amostra (1/6 do volume final) e água e carregado num gel de agarose. Na mesma corrida de eletroforese foram também carregadas amostras do vetor Tspan18cKO extraído de *E. coli* M.O.S linearizado e não linearizado e do marcador de pesos moleculares *1Kb+ DNA ladder* (anexo I).

A visualização das bandas de ADN correspondentes por incidência de ultravioletas permitiu estimar o seu tamanho (em pares de bases (pb)) e concluir se ocorreu ou não a perda de 1995 pb correspondente à sequência do vetor flanqueada pelos dois primeiros locais *loxP*, ou de 1771

pb correspondentes à sequência flanqueada pelo segundo e pelo terceiro locais *loxP*, ou de 3766 pb correspondentes à sequência flanqueada pelo primeiro e terceiro locais *loxP*.

3.5.1.7. Linearização e purificação para eletroporação

A aplicação de pulsos elétricos em células eucariotas permite a entrada de ADN através dos poros que se formam na membrana celular (Neumann, Schaefer-Ridder, Wang, & Hofschneider, 1982; Potter, Weir, & Leder, 1984; Sugden, Marsh, & Yates, 1985; Toneguzzo, Hayday, & Keating, 1986; Tur-Kaspa, Teicher, Levine, Skoultchi, & Shafritz, 1986; T.-K. Wong & Neumann, 1982). A eficiência da transfeção por eletroporação é influenciada por um conjunto de fatores, entre eles, a conformação e concentração do ADN. Apesar de ser possível transfetar quer ADN circular quer ADN linear, os níveis mais elevados, quer de transformação estável quer de expressão transiente, são obtidos quando se usa ADN linear (Neumann et al., 1982; Potter et al., 1984; Toneguzzo et al., 1986). Regra geral, a transfeção efetiva é obtida com concentrações de ADN na suspensão celular, entre 1 µg/mL e 40 µg/mL (Sambrook & Russell, 2001b).

Tendo-se confirmado que a enzima *NotI* apresenta apenas um local de reconhecimento no vetor Tspan18cKO (veja-se 3.5.1.4.), procedeu-se à digestão de ADN plasmídico extraído em grande escala (tal como descrito em 3.5.1.3.) com esta enzima.

Para tal, foram realizadas diversas reações em que a cada 1 µg de ADN plasmídico foram adicionadas 1 U de enzima *NotI* (NEB[®], R0189S), 1/10 do volume final em tampão específico da enzima e 1/100 do volume final em BSA. As reações de linearização decorreram a 37°C em manta de aquecimento durante 6 horas.

O produto da restrição foi posteriormente purificado por extração com fenol-clorofórmio por se tratar de um plasmídeo muito grande (15 Kb) e por termos quantidades de ADN plasmídico digerido superiores às possíveis de extrair de um gel de agarose.

O protocolo de extração por fenol-clorofórmio seguido foi adaptado do descrito por Sambrook (Sambrook & Russell, 2001c).

Após avaliação da concentração (realizada tal como descrito em 3.5.1.3.) de ADN plasmídico linearizado, numa amostra representativa, a concentração da solução de ADN plasmídico foi ajustada a 1 µg/mL, adicionando o volume necessário de H₂O destilada livre de nucleases (Sigma-aldrich[®], W4502).

3.5.2. Células estaminais embrionárias

Foram utilizadas células estaminais embrionárias (CEEs) da linha R1. A cultura primária de CEEs da linha R1 foi estabelecida em agosto de 1991 no laboratório do Doutor Andras Nagy em Toronto, no *Mount Sinai Hospital*. As CEEs da linha R1 são derivadas de um cruzamento F1 entre subestirpes consanguíneas 129/Sv e 129/Sv-CP. A cultura primária foi isolada do epiblasto de um blastocisto com 3,5 dpc, de sexo masculino. A pluripotência das células R1 foi testada por agregação com embriões tetraplóides (o embrião resultante é completamente derivado das células R1) (András Nagy, Rossant, Nagy, Abramow-Newerly, & Roder, 1993), agregação com embriões diplóides (o embrião resultante é uma quimera) (Wood, Allen, Rossant, Auerbach, & Nagy, 1993) e por injeção de células R1 no blastocélio de blastocistos. Os embriões gerados por estes métodos, que completavam o ciclo de desenvolvimento embrionário, davam origem a ratinhos que atingiam a idade adulta e eram férteis. Este fato foi, no entanto, ajudado pelo baixo número de passagens da linha R1 à data, especialmente nos resultados das agregações com embriões tetraplóides.

As CEEs da linha R1 são derivadas de ratinhos com pelagem *agouti*. O gene que condiciona a ocorrência de pelagem *agouti* tem dois alelos, sendo o dominante responsável pela coloração preta na pelagem enquanto o recessivo é responsável por uma cor castanha escura. A presença de alelos de outros genes, que também controlam a cor da pelagem, pode conduzir a outros tons de pelagem, que são, no entanto, facilmente distinguíveis da pelagem albina.

As colônias de CEEs costumam ter um aspeto brilhante e contornos regulares, crescem normalmente em aderência a uma camada de células “*feeders*” (cultura primária de fibroblastos embrionários murinos) ou a uma camada de gelatina. A partir de uma suspensão de células individualizadas, plaqueada, as células crescem como colônias de origem clonal. Estas colônias têm uma forma de cúpula e aspeto brilhante no microscópio invertido. A ocorrência de diferenciação, resulta no aparecimento de colônias achatadas e escuras, com rebordos irregulares e opacos.

3.5.3. Cultura e manutenção de células estaminais embrionárias de murganho da linha R1 (*agouti*).

Quando as células estaminais embrionárias são cultivadas diretamente em matrizes sólidas de polistireno, próprias para cultura de tecidos, o seu fenótipo distinto é rapidamente perdido e as células iniciam um processo de diferenciação espontânea caracterizado por uma alteração na morfologia celular e perda de marcadores de pluripotencialidade, como OCT4 e NANOG (Amit et al., 2000; Reubinoff, Pera, Fong, Trounson, & Bongso, 2000; Thomson et al., 1998). Isto indica que as propriedades celulares que as distinguem são influenciadas pelo seu

microambiente, pelo que, são necessárias condições e procedimentos de cultura particularmente rigorosos para manter as suas características únicas *in vitro* (Lewis, Bryan, & Hunt, 2012). Para manter tipos celulares com estas propriedades em culturas de baixa densidade (ou densidade clonal), é necessário utilizar uma camada de células menos fastidiosas que condicionam o meio. As células “*feeders*” providenciam quer sinalização por contacto quer proteínas exógenas essenciais, como fatores de crescimento e citocinas, que permitem a proliferação e auto-renovação das células embrionárias estaminais (Lewis et al., 2012).

Assim, as CEEs podem ser mantidas num estado indiferenciado se forem colocadas em cultura em placas previamente cobertas por uma monocamada de células *feeders* (cultura primária de fibroblastos embrionários mitoticamente inativados) ou em placas gelatinizadas, desde que se adicione ao meio de cultura o *fator inibitório da leucemia* (LIF – *Leukemia Inhibitory Fator*) (A. G. Smith et al., 1988; Williams et al., 1988).

3.5.3.1. Tratamento das culturas de fibroblastos embrionários primários com mitomicina-C.

Para impedir que os fibroblastos embrionários proliferem e compitam por nutrientes com as CEEs, é necessário inativar o seu processo mitótico por irradiação ou quimicamente com mitomicina-C. Deste modo a cultura permanece ativa metabolicamente, continuando a produzir os fatores de crescimento auxiliares ao crescimento e manutenção do estado indiferenciado das CEEs, mas não ocorre multiplicação celular de fibroblastos. À cultura primária de fibroblastos embrionários mitoticamente inativados dá-se o nome de “*feeders*”.

A mitomicina-C é um antibiótico antineoplásico produzido por *Streptomyces caespitosus* e é um dos agentes alquilantes (*alkylating*) bi- ou tri- funcionais com capacidade para interligar (*cross-linking*) o ADN e inibir a sua síntese (National Center for Biotechnology Information, 2004).

Os fibroblastos embrionários murinos utilizados foram obtidos de um lote já existente no laboratório. Este lote foi constituído a partir de fibroblastos embrionários primários, isolados de embriões murinos da estirpe CD-1, com apenas uma passagem, cultivados em frascos T75 e congelados em dois criotubos por cada frasco quando alcançavam cerca de 80% de confluência. Quando necessário, um criotubo foi descongelado e passado para um frasco T75. No dia seguinte realizou-se uma passagem na razão de 1:3 de modo a obter mais fibroblastos para tratar com mitomicina-C.

Após remoção do meio de cultura dos três frascos T75, por aspiração, os tapetes celulares de fibroblastos foram lavados duas vezes com PBS estéril (anexo I). De seguida, a cada frasco, foi adicionado 10 mL de meio de cultura de fibroblastos (anexo II) com 100 µL de uma solução de

mitomicina-C (Sigma-Aldrich® M0503) a 1 mg/mL. Após incubação a 37°C com 5% CO₂ durante 150 minutos, o meio com mitomicina-C foi removido por aspiração e os tapetes celulares foram lavados três vezes com PBS estéril. Posteriormente, as células foram destacadas, lavadas e ressuspensas em meio de congelação (meio de cultura de fibroblastos adicionado de 10% DMSO (Hybri-Max™, Sigma-Aldrich®, D2650)), por pipetagem com pipeta de Pasteur de vidro (Volac®, D812) de modo a assegurar a formação de uma suspensão celular de célula única. A suspensão celular foi depois distribuída por criotubos (Nunc™, 377224) (1 mL/criotubo) que ficaram armazenados durante uma noite a -80°C antes de serem transferidos para o contentor de azoto líquido.

3.5.3.2. Gelatinização de placas

De modo a certos tipos de CEEs, assim como células *feeder*, aderirem eficientemente à superfície de recipientes próprios para cultura de tecidos, é necessário revestir previamente a superfície de cultura com gelatina. Regra geral, as placas são mais fáceis de manipular do que os frascos e ajudam a minimizar os efeitos de movimentos dos fluídos, causados por alterações da posição dos frascos, que poderiam conduzir ao destacamento das colónias de células estaminais pouco aderentes.

A solução de gelatina (Sigma-Aldrich G1890) a 0,1% (p/v), autoclavada e filtrada (Stericup-GV, Durapore, 0,22 µm, Merck Millipore SCGVU05RE), foi distribuída pelas placas de acordo com a área a revestir (aproximadamente 100 µL por poço de placa de 96 poços, 3 mL por placa de 60 mm e 5 mL por placa de 100 mm) e estas repousaram fechadas, na horizontal, na câmara de fluxo, durante cerca de 20 minutos à temperatura ambiente. Após remoção de toda a gelatina por aspiração, as placas ficaram destapadas, dentro da câmara de fluxo, durante 5 minutos para que a gelatina remanescente evaporasse. As placas assim preparadas foram armazenadas a 4°C durante uma semana, desde que devidamente seladas, ou usadas logo de seguida.

3.5.3.3. Preparação de *feeder layers*

Quando necessário, um criotubo de fibroblastos embrionários murinos mitoticamente inativados, preparado tal como descrito em 3.5.3.1, foi descongelado. A suspensão celular foi lavada e o precipitado celular obtido após a segunda centrifugação foi ressuspenso em 30 mL de meio de cultura de fibroblastos e distribuído por placas gelatinizadas de acordo com a sua área.

Os fibroblastos embrionários primários inativados mitoticamente deverão ser sempre plaqueados em muito baixa densidade. Assim, regra geral, para placas de 100 mm diâmetro (Corning®, 430167) eram distribuídos 5 mL da suspensão celular e para placas de 60 mm de

diâmetro (Corning®, 430166), 2,5 mL. Após adição do volume de meio de cultura para fibroblastos, necessário para completar o volume de trabalho de cada tipo de placa, as células foram incubadas (37°C com 5% CO₂) durante a noite para permitir a sua aderência à matriz de polistireno.

No dia seguinte, o meio de cultura de fibroblastos foi removido por aspiração e substituído por meio de cultura das CEEs.

3.5.3.4. Produção de *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF)

O LIF é normalmente expresso na trofoectoderme do embrião em desenvolvimento sendo o seu recetor, o LIFR, expresso pelas células do epiblasto. Uma vez que as células embrionárias estaminais derivam do epiblasto do blastocisto, a sua separação do blastocisto remove também a sua fonte de LIF. A ausência deste fator, leva as CEEs a diferenciarem-se apesar de manterem o seu potencial proliferativo ou pluripotência. Assim, o LIF é um fator indispensável no meio de cultura das CEEs.

O fator inibitório da leucemia (LIF – *Leukemia Inhibitory Factor*) foi produzido de acordo com um protocolo já estabelecido no laboratório de acolhimento. Para a preparação do LIF utilizou-se uma estirpe de *E. coli* transformada com um plasmídeo, o pGEX-2T-MLIF, originalmente obtido do laboratório do Dr. John Heath (Mereau, Grey, Piquet-Pellorce, & Heath, 1993). Este método permite a produção de aproximadamente 1,5 mg de LIF purificado.

A partir de um *stock* de glicerol de *E. coli* transformada com o plasmídeo referido, foi realizado um riscado em placa de LB com ampicilina (anexo II). Após incubação na estufa a 37°C, durante a noite, foi possível picar 3-4 colónias bem isoladas para 50 mL de meio LB (anexo II) com ampicilina (na concentração final de 100 µg/µL) num *Erlenmeyer* com 250 mL de capacidade. A cultura foi incubada a 37°C durante a noite, com agitação (200 rpm) na incubadora orbital (Gallemkamp). No dia seguinte foram utilizados 500 µL da cultura que ficou a incubar durante a noite, para inocular 500 mL de meio LB com ampicilina (na concentração final de 100 µg/µL) num *Erlenmeyer* com 2 L de capacidade. A cultura foi incubada a 37°C, com agitação (200 rpm) na incubadora orbital (Gallemkamp). A cada 40 minutos foi recolhida uma amostra da cultura com cerca de 1,5 mL para uma cuvete de espectrofotometria e foi lida (Ultrospec®3100pro, Amersham pharmacia) a densidade óptica a 600 nm (O.D₆₀₀) contra a amostra branco (meio de cultura LB não inoculado). Quando a O.D₆₀₀ alcançou valores entre 0,6 e 1,0 (o que normalmente acontecia ao fim de 3 horas de incubação), foi induzida a expressão do LIF por adição de 500 µL de uma solução de IPTG a 100 mM (anexo I), feita de fresco. Após um período de incubação de cerca 3-4 horas, a 37°C com agitação (200 rpm) na incubadora orbital, a cultura foi colocada sobre gelo, dividida por dois copos de centrífuga

(Nalgene® style 3120, Sigma-Aldrich B1033) previamente arrefecidos e centrifugada (Beckman Coulter Avanti® J-26XPI) a 5000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi eliminado por decantação e cada precipitado celular foi ressuspenso em 5 mL de MTPBS (anexo I) sobre gelo. Estas suspensões celulares foram ambas transferidas para um só tubo de centrífuga de polipropileno, com 50 mL de capacidade, previamente arrefecido. Mantendo o tubo de centrífuga sobre gelo, as células foram lisadas por sonicação (4 ciclos de 30 segundos de ultrassons seguidos de 30 segundos de pausa (Bandelin sonoplus UW2070). Imediatamente após a lise, foi adicionado 1 mL de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, T8787) a 10% (v/v) (anexo I), a mistura foi homogeneizada no *vortex* e mantida sobre gelo durante 5 minutos. O lisado celular foi transferido para um tubo de centrífuga de vidro (Kimble HS No 45500-30), previamente arrefecido, e centrifugado a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (cerca de 10 mL) foi recolhido para um tubo de centrífuga de polipropileno, estéril, sobre gelo, e foram adicionados 5 mL de microesferas de sepharose-glutathiona (*Glutathione Sepharose beads*, Amersham-GE #17-0757-01) a 50% (v/v) em MTPBS que tinham sido preparadas anteriormente de acordo com as instruções do fabricante. A ligação do LIF às microesferas decorreu durante a noite, a 4°C, com agitação por rotação lenta horizontal (*roller*). No dia seguinte, o ligado foi transferido para um tubo de polipropileno, com 50 mL de capacidade, onde tinha sido previamente adicionado 15 mL de uma solução de sucrose a 20% (v/v) em MTPBS. Após uma centrifugação (Sigma laborzentrifugen® 3K10) a 2500 rpm, durante 5 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi eliminado e as microesferas com o LIF ligado, presentes no precipitado, foram lavadas sequencialmente, por centrifugações a 2500 rpm durante 5 minutos, a 4°C, nas soluções seguintes (a forma de preparação encontra-se no anexo I):

1× tampão de lavagem 1 (1% Triton™ X-100 em MTPBS)

1× tampão de lavagem 2 (50 mM Tris 8,5 + 150 mM NaCl em dH₂O)

1× tampão de eluição (tampão lavagem 2 + 2,5 mM CaCl₂)

Ao precipitado final de microesferas com o LIF ligado, foi adicionado 750 µL de tampão de eluição. A clivagem da ligação entre as microesferas e o LIF foi realizada por adição de 50 µL de trombina (Amersham-GE #27-0846-01) + 950 µL PBS por cada 1 mL de suspensão original (a 75%) de microesferas utilizada, seguida de uma incubação durante 6 horas, à temperatura ambiente, com agitação num *roller*. No final deste período de incubação, foi feita uma centrifugação a 4700 rpm, durante 5 minutos, a 4°C, e o primeiro sobrenadante com o LIF foi recolhido para um tubo de polipropileno estéril mantido sobre gelo. As microesferas presentes no precipitado foram posteriormente lavadas mais 4 vezes com 2 mL de tampão de eluição, centrifugando nas mesmas condições. O sobrenadante resultante de cada lavagem foi

transferido para um tubo de polipropileno estéril, individual. As microesferas foram depois guardadas a 4°C para regenerar, de acordo com as instruções do fabricante, e reutilizar.

O primeiro sobrenadante foi esterilizado por filtração (filtro 0,22 µm; Merck Millipore, SLGV033RB), na câmara de fluxo laminar, e posteriormente alíquotado e armazenado a -20°C. Após a produção e purificação do LIF por este método, a concentração foi determinada pelo microensaio do método de Bradford utilizando como controlo LIF de lotes mais antigos e com concentração conhecida. O estado de pureza da proteína foi ainda avaliado por SDS-PAGE. Note-se que o fator LIF tem um peso molecular de cerca de 20 kDa, a trombina cerca de 34 kDa e as microesferas 26 kDa.

Constituiu-se um lote de cerca 50 alíquotas de 30 µL, com uma concentração de 560 µg/mL. Cada alíquota permitiu tratar 100 mL de meio de cultura para CEEs.

3.5.3.5. Descongelação das CEEs

Quando necessário, um criotubo com CEEs R1, com 15 passagens, foi descongelado e o precipitado celular obtido após a segunda lavagem foi ressuspenso em 3 mL meio de cultura para CEEs (anexo I) previamente aquecido em banho-maria a 37°C e suplementado com LIF, por diversas pipetagens com pipeta de Pasteur de vidro de modo a assegurar a formação de uma suspensão celular de células isoladas. A suspensão celular de 3 mL foi depois homogeneizada em mais 7 mL de meio e distribuída equitativamente por duas placas de cultura com 100 mm de diâmetro (Corning®, 430167) previamente gelatinizadas (tal como descrito em 3.5.3.2.), com uma camada de células *feeder* (preparada tal como descrito em 3.5.3.3.) e 5 mL de meio de cultura para CEEs suplementado com LIF. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. O meio de cultura foi mudado cerca de 8 horas depois ou 16 horas depois (caso a descongelação fosse feita no final do dia) e foi verificado se as CEEs aderiram ou não à camada de *feeders* e se a sua morfologia era a correta. Esta mudança de meio servia também para remover células mortas, que não sobreviviam ao processo de descongelação e que, por isso, se mantinham em suspensão (sem aderirem à camada de *feeders*). O meio foi depois mudado a cada 24 horas até ser alcançada uma confluência de cerca 70% (normalmente cerca de dois dias depois da descongelação), altura em que foram passadas na razão de 1:5.

3.5.3.6. Passagem das CEEs

Uma vez que o contato entre colónias de CEEs induz o indesejável efeito de diferenciação deste tipo celular, é extremamente importante a observação e mudança de meio diária para que sejam passadas num estado de subconfluência.

Começou-se por aspirar o meio e realizar duas lavagens com PBS. Após a segunda lavagem, aspirou-se bem todo o PBS e adicionou-se um volume de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco[®], 25200-056) de acordo com a área de cultura (regra geral 5 mL para placas de 100 mm, 2,5 mL para frascos T25, 1 mL para cada poço de placas de 6 poços, 200 µL para cada poço de placas de 4 poços e 30 µL para cada poço de placas de 96 poços).

A tripsina é uma protease e a sua ação sobre as proteínas extracelulares de adesão e componentes da matriz, é responsável pela individualização celular que se pretende com este tratamento. O EDTA é um agente quelante, frequentemente adicionado à tripsina, para aumentar a sua atividade enzimática por neutralizar os iões de cálcio e magnésio que participam e fortalecem a adesão intercelular e ainda ocultam as ligações peptídicas onde a tripsina tem de atuar.

Esta individualização celular é muito importante pois se ficarem agregados celulares, estes vão crescer como grupos celulares em que começam a surgir centros necróticos e zonas de diferenciação à periferia (notam-se pelo fato de os rebordos do agregado colonial perderem o brilho). Ao longo do tempo de incubação com tripsina deve-se ir observando as células num microscópio invertido, de modo a que o momento em que as células se soltam do fundo e entre si seja prontamente detetado e a reação interrompida. O soro fetal bovino presente no meio de cultura é o principal responsável pela inibição da atividade da tripsina, atuando quer por inibição do produto final como por diluição da enzima.

Após uma incubação de 5-7 minutos a 37°C na estufa, as CEEs foram destacadas e homogeneizadas na solução de tripsina pipetando 4 a 5×. A suspensão celular foi depois rapidamente transferida para um tubo de centrifuga com meio de cultura para CEEs onde foi igualmente homogeneizada pipetando gentilmente. A superfície de cultura foi depois lavada com meio de cultura que também foi adicionado à suspensão celular no tubo de centrifuga. Após uma centrifugação a 200 ×g durante 5 minutos, à temperatura ambiente, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado celular foi ressuspenso pipetando várias vezes, gentilmente, em meio de cultura de CEEs suplementado com LIF. Este passo é complementar da ação da tripsina pois também tem por objectivo separar fisicamente os poucos agregados celulares que restem. A suspensão celular foi depois distribuída por novas placas de modo a fazer uma passagem na razão de 1:5 a 1:7. As novas placas foram sempre previamente gelatinizadas, revestidas por uma camada de células *feeder* e adicionadas de meio de cultura para CEEs suplementado com LIF aquecido a 37°C.

Quando a suspensão celular se destinava à eletroporação, as células de duas placas de 100 mm foram passadas para dez placas de 100 mm gelatinizadas.

3.5.4. Eletroporação do ADN plasmídico linearizado nas CEEs

O método mais comum de criar CEEs geneticamente modificadas é introduzir ADN exógeno nas células por eletroporação (3.5.1.7) e subsequentemente selecionar a integração no genoma (veja-se 3.5.1.).

A técnica de transformação mais versátil e eficaz é a eletroporação, que usa correntes elétricas pulsadas muito precisas para induzir a formação temporária de poros nas membranas (bicamadas fosfolipídicas) das células. O material genético extracelular pode assim passar através destes poros temporários e ser assimilado pelo ADN das células-alvo. Com a escolha apropriada do tempo do pulso, voltagem e forma da onda elétrica, a perturbação das membranas celulares é minimizada, aumenta-se a viabilidade das células-alvo e é possível alcançar de forma reprodutível e rotineira, eficiências de transformação próximas de 80%. Por estas razões, a eletroporação tornou-se na técnica mais popular de transformação para muitos tipos celulares. Em cada sessão de eletroporação foram utilizadas CEEs de 10 placas de 100 mm que alcançavam cerca de 80% de confluência dois dias após terem sido passadas. As CEEs de cada placa foram destacadas por ação da tripsina (tal como descrito em 3.5.3.6). Após uma lavagem em meio de cultura para CEEs, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura para CEEs e a sua concentração determinada através do uso de um hemocítmetro (tal como descrito em 3.4.1.2.).

De seguida a suspensão celular foi centrifugada a $200 \times g$ durante 5 minutos, à temperatura ambiente, e após eliminação do sobrenadante por aspiração, o precipitado celular foi ressuspenso no volume de PBS (sem cálcio e sem magnésio) necessário para ajustar a concentração a 1×10^7 CEEs/mL. Esta ressuspensão foi feita pipetando gentilmente, várias vezes, com pipeta de vidro. Neste passo é extremamente importante obter uma suspensão celular de célula-única.

Em cada cuvete de eletroporação (BioRad, #165-2088) foram colocados 770, 780 ou 790 μ L da suspensão de CEEs a 1×10^7 CEEs/mL e respetivamente 30, 20 ou 10 μ L (cerca de 30, 20 ou 10 μ g) da solução de ADN plasmídico (a 1 μ g/mL) linearizado e purificado tal como descrito em 3.5.1.7.

Cada cuvete assim preparada foi colocada no suporte ligado ao eletroporador (*BioRad GenePulser®II* com o módulo *Capacitance Extender Plus*) no qual foram predefinidas as condições do pulso elétrico: 250 μ V e 500 μ F. Após a aplicação do pulso elétrico, cada cuvete foi imediatamente colocada sobre gelo durante 30 minutos para assegurar o encerramento dos poros formados nas membranas celulares das CEEs. A suspensão celular de cada cuvete foi depois transferida para um tubo de centrífuga com 9 mL de meio de cultura para CEEs (suplementado com LIF) e distribuída por uma ou duas placas de 100 mm diâmetro previamente

gelatinizadas e com um volume de meio de cultura para CEEs (suplementado com LIF) suficiente para completar 20 mL.

O meio foi mudado na manhã seguinte (permitindo a remoção de todas as CEEs mortas no processo de eletroporação e que permanecem em suspensão) e diariamente até se iniciar a seleção.

3.5.5. Seleção de colônias de CEEs resistentes a Geneticina[®] (G418) e Ganciclovir

Dois dias após a eletroporação, o meio de cultura passou a ser suplementado com geneticina[®] (50 mg/mL; Gibco[®], 10131-019) na concentração final de 150 µg/mL para seleção positiva. No dia seguinte a ter sido iniciada a seleção positiva, iniciou-se também a seleção negativa com ganciclovir (Sigma-Aldrich[®], G2536; ressuspensão na concentração de 10 mM em HCl 0,1 N e diluído em dH₂O estéril para obter alíquotas de trabalho a 2 mM) na concentração final de 2 µM. A expressão de um gene suicida, que codifica uma enzima viral como a timidina cinase, resulta na fosforilação da pró-droga não tóxica ganciclovir, um análogo nucleósido. Este análogo, quando fosforilado, é incorporado no ADN das células em replicação ativa conduzindo à sua morte.

Assim, regra geral, a cada 100 mL de meio de cultura de CEEs, suplementado com LIF, foram adicionados 300 µL de geneticina (50 mg/mL) e 100 µL de ganciclovir (2 mM).

Nos 7 dias seguintes o meio de cultura foi mudado diariamente e substituído por meio de cultura de CEEs suplementado com LIF, geneticina e ganciclovir. A seleção positiva durou assim 8 dias e a negativa 7 dias.

3.5.5.1. Isolamento dos clones resistentes

Dez dias após a eletroporação, as colônias de CEEs resistentes à seleção, bem individualizadas, sem sinais de diferenciação e com cerca de 1-2 mm de diâmetro, foram removidas das placas de 100 mm.

Para destacar as colônias, estas têm de ser observadas sob a lupa de dissecação colocada no interior da câmara de fluxo laminar.

Após eliminar o meio de cultura por aspiração, as colônias resistentes foram lavadas duas vezes com PBS. No final da segunda lavagem deixou-se ficar um volume de PBS suficiente para cobrir o fundo da placa. As colônias foram destacadas pipetando na sua periferia, num ângulo de aproximadamente 45°, com uma ponta amarela acoplada a uma micropipeta Gilson P20. Cada colônia destacada foi aspirada para um volume de 10 µL no interior da ponta amarela e transferida para um poço de uma placa de 96 poços com fundo em V (Greiner CELLSTAR[®], 651160) onde se colocou previamente 40 µL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco[®], 25200-056).

As células de cada colónia foram ressuspensas na tripsina por pipetagem gentil. Este procedimento foi repetido para todas as colónias com as referidas características, presentes em cada placa de 100 mm onde as CEEs eletroporadas tinham sido plaqueadas. Quando todas as colónias (até um máximo de 48) de uma placa tinham já sido picadas e transferidas para a tripsina, a placa de 96 poços com fundo em V foi colocada na incubadora a 37°C, com 5% de CO₂, durante cinco a dez minutos. No final da incubação, com um pipetador multicanal (8 canais; Multipipetor Costar[®]) as células em suspensão na tripsina foram transferidas para os poços equivalentes de uma placa de 96 poços com fundo plano, gelatinizado, que tinham já 150 µL de meio de cultura para CEEs pré-aquecido. Após pipetagens gentis e repetidas, para assegurar a correta homogeneização e formação de uma suspensão de células isoladas, a placa foi colocada na incubadora a 37°C com 5% de CO₂. O meio de cultura (meio para CEEs suplementado com LIF, sem geneticina e sem ganciclovir) foi mudado na manhã seguinte e diariamente até ser alcançada 80% de confluência na maioria dos poços, altura em que se realizou a passagem para novas placas.

3.5.5.2. Passagem das células estaminais em placas de 96 poços

Apesar de se tentar picar colónias de CEEs com tamanho mais semelhante possível, é bastante comum colónias diferentes apresentarem potenciais de crescimento diferentes, pelo que o momento de passagem foi definido como sendo o dia em que mais de 50% das colónias tinham já alcançado 80% de confluência, o que foi determinado por observação no microscópio invertido e registo detalhado do aspeto das colónias em cada poço, de cada placa.

Após remover o meio de cultura utilizando um aspirador multicanal (Aspirator Costar[®]3073) com pontas amarelas, as colónias de cada poço foram lavadas com 200 µL de PBS. O PBS da lavagem foi igualmente removido por aspiração e de seguida distribuiu-se 30 µL de tripsina-EDTA a 0,25% em cada poço e colocou-se a placa na incubadora a 37°C, 5% CO₂. Passados cinco minutos o destacamento foi ainda promovido fisicamente dando pancadas ligeiras nas laterais da placa fechada. Tendo-se confirmado o destacamento das colónias do fundo da placa e a separação das células de cada colónia, por observação no microscópio invertido, a ação da tripsina foi interrompida por adição de 70 µL de meio de cultura e ressuspensão por 4 a 6 pipetagens. As células assim ressuspensas foram divididas por duas placas de 96 poços com fundo plano, gelatinizado, com 150 µL de meio de cultura para CEEs suplementado com LIF, pré-aquecido.

Dois dias após esta primeira passagem, as células de uma das placas foram congeladas (congelação precoce; veja-se 3.5.5.3.) e as da outra foram passada na razão de 1:2 (repetindo-se a metodologia descrita acima) para amplificar os clones. Passadas 48 horas, as células de

uma dessas placas foram congeladas (congelamento tardio; veja-se 3.5.5.3.) e as da outra foram passadas mais uma vez, na razão de 1:2, para crescerem até um estado de sobreconfluência, regra geral ao fim de 3 a 4 dias, altura em que se removeu o meio de cultura e se efetuou a extração de ADN (veja-se 3.5.5.4.) de uma das placas (as células da outra placa ficaram armazenadas a -20°C, servindo de *backup* para a extração de ADN).

3.5.5.3. Congelamento das CEEs em placas de 96 poços

Até ficarmos a saber quais os clones de CEEs em que ocorreu efetivamente recombinação homóloga com o vetor de clonagem e como as placas de 96 poços não podem ser guardadas em azoto líquido, as CEEs eletroporadas e resistentes à seleção positiva e negativa, tiveram de ser armazenadas a -80°C. As células não deverão ser armazenadas nestas condições por mais de dois meses sob pena de perdas significativas de viabilidade.

No dia em que a maior parte dos clones alcançou cerca de 80% de confluência, duas a três horas antes da congelamento, o meio de cultura foi mudado. De seguida, após remoção do meio (por aspiração com o aspirador multicanal) e lavagem das colónias com 200 µL de PBS, as células foram destacadas colocando 30 µL de tripsina-EDTA em cada poço. A placa foi colocada na incubadora a 37°C com 5% de CO₂, durante cinco minutos. Findo esse tempo, tendo-se confirmado por observação no microscópio invertido que as células já se tinham destacado do fundo dos poços e entre si, parou-se a ação da tripsina por adição de 70 µL de meio para CEEs e homogeneização por pipetagens sucessivas (de modo a garantir a formação de uma suspensão de células isoladas) com o pipetador multicanal.

De seguida, a cada poço foi adicionado 100 µL de meio de congelamento para CEEs 2× concentrado (anexo I), preparado no próprio dia e pré-arrefecido a 4°C, e homogeneizou-se com a suspensão celular por pipetagens sucessivas. Por fim, a suspensão celular de cada poço foi coberta com 30 µL de óleo mineral (Sigma-Aldrich, M-8410) e as placas foram seladas com parafilme de modo a prevenir perdas por evaporação.

3.5.5.4. Extração do ADN genómico em placas de 96 poços

A extração de ADN das CEEs resistentes foi feita 3 a 4 dias após a última passagem, quando estas alcançavam praticamente 100% de confluência na maior parte dos poços das placas de 96 poços.

Após remoção do meio de cultura por aspiração, as colónias de cada poço foram lavadas duas vezes com 100 µL de PBS. De seguida distribuiu-se 50 µL de tampão de lise para CEEs (anexo

I) em cada poço, as placas foram bem seladas com parafilme e incubadas a 37°C, na estufa, durante a noite para permitir a lise celular.

No dia seguinte, removeu-se o parafilme e distribuiu-se em cada poço 100 µL de etanol absoluto (Merck Millipore, 100983). Após colocar a placa numa superfície estável sem qualquer perturbação, seguiu-se uma incubação de três horas à temperatura ambiente para permitir a precipitação do ADN genómico. No final do período de incubação o etanol foi removido por simples inversão de cada placa destapada, sobre toalhas de papel. O ADN precipitado, presente no fundo de cada poço, foi lavado três vezes adicionando 150 µL de etanol a 70% (v/v) que era removido por inversão da placa sobre toalhas de papel.

No final das lavagens as placas foram deixadas a secar ao ar, destapadas, durante cerca de 15 minutos para permitir a evaporação dos vestígios de etanol. O ADN precipitado foi ressuspensão adicionando 20 µL de tampão TE (anexo I) a cada poço e agitando a placa num agitador horizontal à temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos. As placas com o ADN ressuspensão foram seladas com parafilme e armazenadas a -20°C.

3.5.6. Seleção dos clones recombinantes por PCR

A correta integração do vetor de mutação foi determinada realizando PCRs com oligonucleótidos iniciadores (*primers*) desenhados tanto para o braço de direito de homologia, como para o braço esquerdo de homologia.

Infelizmente a introdução de mutações por recombinação homóloga é um processo bastante ineficiente em células mamíferas: apenas uma pequena percentagem de todas as colónias resistentes ao processo de seleção apresenta a integração do vetor de mutação no local correto, um evento que pode ter uma frequência tão baixa como 1 em cada 1000 para alguns *loci* genómicos. O mais frequente é os clones eletroporados apresentarem a integração aleatória do ADN do vetor de mutação (Mcdermott, Zhao, & Sauer, 2004).

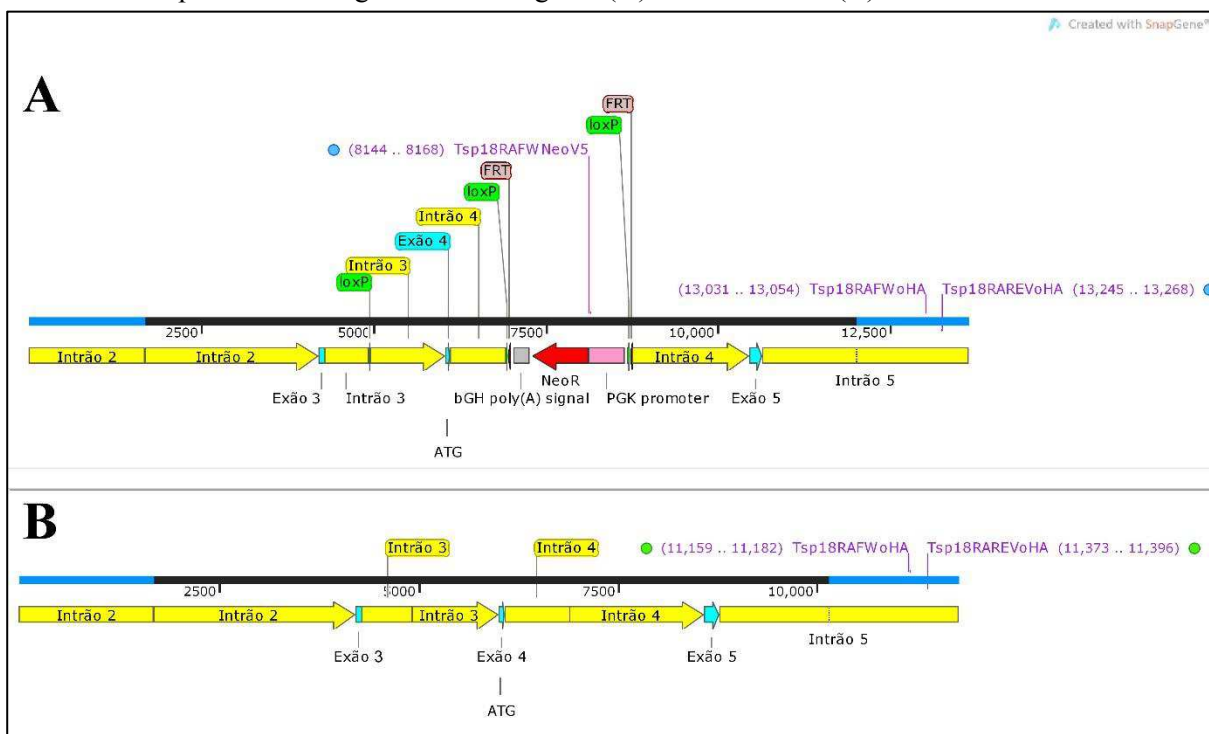
Apesar de se conseguirem melhorias significativas nesta percentagem de células com a integração do ADN do vetor de mutação no local correto do genoma, aumentando (K. R. Thomas & Capecchi, 1987) os braços de homologia (Riele, Manndag, & Berns, 1992) deste e incorporando uma cassette de seleção negativa, além de uma cassette de seleção positiva, os clones resistentes têm de ser analisados para se confirmar e identificar quais são os verdadeiros recombinantes homólogos (Mcdermott et al., 2004).

Após a eletroporação do vetor de *targeting*, as colónias de CEEs resistentes à geneticina e ao ganciclovir são frequentemente rastreadas por PCR dada a necessidade de analisar rapidamente diversas centenas de colónias e a quantidade limitada de ADN possível de obter a partir de um único poço de uma placa de 96 poços. As típicas reações de PCR desenhadas para este fim,

incluem uma sequência iniciadora no gene *neo* e uma segunda sequência iniciadora que hibrida no ADN genómico a jusante do final da região incluída no braço de homologia do vetor de *targeting* (Kontgen & Stewart, 1993).

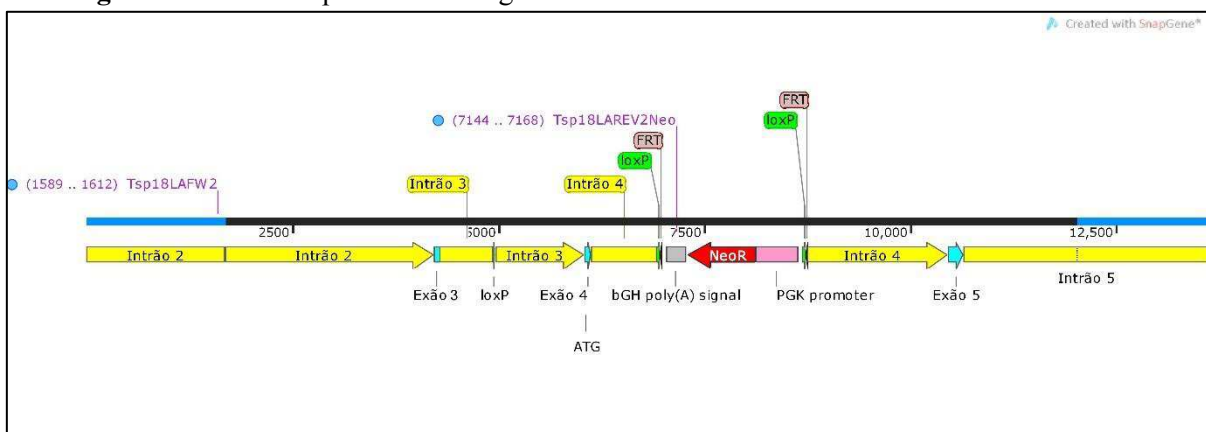
O rastreio inicial foi feito com sequências iniciadoras desenhadas para detetar a recombinação com o braço direito de homologia. Foram utilizadas três sequências iniciadoras em simultâneo: duas diretas, uma que hibrida na cassette de seleção positiva (Tsp18RAFWNeoV5) e uma que hibrida cerca de 1026 pb a jusante do final do braço direito de homologia (Tsp18RAFWoHA) e uma inversa que hibrida cerca de 1240 pb a jusante do final do braço de homologia (Tsp18RAREVoHA), no ADN genómico endógeno (Figura 18). As sequências dos oligonucleótidos iniciadores e as condições da reação (Tsp18RA) encontram-se no anexo IV. Este conjunto de sequências iniciadoras permite obter um fragmento controlo (alelo *WT*), com 238 pb, correspondente ao produto da amplificação entre a sequência iniciadora direta (Tsp18RAFWoHA) e a sequência iniciadora inversa (Tsp18RAREVoHA) que hibridam fora do braço de homologia, e um fragmento mutante (5141 pb) presente apenas nos clones onde ocorreu recombinação homóloga num dos alelos (a situação mais frequente), correspondente ao produto da amplificação entre a sequência iniciadora direta que hibrida na cassette de seleção positiva (Tsp18RAFWNeoV5) e a sequência iniciadora inversa que hibrida fora do braço de homologia (Tsp18RAREVoHA).

Figura 18 - Representação esquemática dos locais de hibridação das sequências iniciadoras utilizadas para detetar a ocorrência de recombinação homóloga com o braço direito de homologia. A barra azul representa ADN genómico endógeno. (A) Alelo mutante. (B) Alelo WT.



Os clones de CEEs em que foi possível amplificar a banda mutante com esta primeira reação de despiste para a recombinação com o braço direito de homologia, foram depois confirmados para a recombinação com o braço esquerdo de homologia. Para este fim foi desenhado apenas um par de sequências iniciadoras: uma sequência direta (Tsp18LAFW2) que hibrida 64 pb a montante do início do braço de homologia, no ADN genómico endógeno, e uma sequência inversa (Tsp18LAREV2Neo) que hibrida na cassette de seleção positiva (Figura 19). As sequências dos oligonucleótidos iniciadores e as condições da reação (Tsp18LA) encontram-se no anexo IV. Este conjunto de sequências iniciadoras permite obter um fragmento mutante com 5583 pb.

Figura 19 - Representação esquemática dos locais de hibridação das sequências iniciadoras utilizadas para detectar a ocorrência de recombinação homóloga com o braço esquerdo de homologia. A barra azul representa ADN genómico.



Os produtos de ambas as reações foram visualizados após eletroforese em gel de agarose realizada de acordo com a metodologia descrita (veja-se 3.6.2.).

3.5.7. Passagem e congelação dos clones de CEEs recombinantes homólogos

Uma vez seleccionados os clones recombinantes homólogos, foi necessário resgatá-los das placas de 96 poços onde tinham sido inicialmente armazenados, para poder amplificá-los de modo a ter células suficientes para agregação com os embriões na fase de mórula de oito células. Foram realizadas 3 passagens, na seguinte sequência:

0,32 cm² para 1,9 cm² (1:6);

1,9 cm² para 9,6 cm² (1:5);

9,6 cm² para 2×T25 ou 50 cm² (1:5)

3.5.7.1. Descongelação da placa de 96 poços

Após remover o parafilme, a placa de 96 poços foi aquecida, colocando o seu fundo em contacto com a superfície de um banho-maria a 37°C durante cerca de 5 minutos. De seguida, o óleo

mineral de cada poço de interesse foi removido por aspiração cuidadosa com o pipetador Gilson P200, num ângulo de cerca 45° relativamente à superfície.

A suspensão celular de cada poço (0,32 cm²) de interesse na placa de 96 poços foi homogeneizada por pipetagens sucessivas e transferida para um poço (1,9 cm²) de uma placa de 4 poços (Thermo Scientific™ Nunc™, 176740) previamente gelatinizado, com uma camada de células *feeder* e 0,5 mL de meio de cultura para CEEs (suplementado com LIF) pré-aquecido. Cada poço de interesse na placa de 96 poços foi ainda lavado com 200 µL de meio de cultura. Em seguida, as células remanescentes foram transferidas com os 200 µL para o respetivo poço na placa de 4 poços. Antes de colocar a placa na incubadora a 37°C, 5% CO₂, homogeneizou-se a suspensão celular por movimentos perpendiculares gentis, da placa tapada, na horizontal.

3.5.7.2. Passagem e amplificação dos clones recombinantes

Cerca de três dias após a descongelação e passagem (1:6) dos clones de interesse para placas de 4 poços, foi feita uma passagem (1:5) das células de cada um desses poços para um poço de uma placa de 6 poços (Thermo Scientific™ Nunc™, 140675), gelatinizado e com *feeders*, seguindo a metodologia já descrita (veja-se 3.5.3.6.). Quando as células alcançaram cerca de 70% de confluência foram passadas na razão de 1:5, neste caso as células de cada poço da placa de 6 poços foram passadas para dois frascos T25 (Thermo Scientific™ Nunc™, 156340) previamente gelatinizados e com *feeders* e incubadas até alcançarem novamente 70% de confluência, altura em que foram congeladas em criotubos.

3.5.7.3. Congelação dos clones de CEEs recombinantes homólogos em criotubos

Normalmente as CEEs são congeladas em criotubos com uma densidade de 5×10⁶ a 10×10⁶ células/mL de meio de congelação.

Cada T25 com 70% de confluência rende cerca de 1,2×10⁷ CEEs, permitindo assim congelar células em dois criotubos (cada um com cerca de 6×10⁶ células em 1 mL de meio de congelação).

Cerca de duas a três horas antes da congelação o meio de cultura foi renovado. Após este tempo, removeu-se o meio de cultura e as colónias de CEEs de cada T25 foram lavadas com 5 mL de PBS. De seguida realizou-se a tripsinização por adição de 2,5 mL de tripsina-EDTA e incubação a 37°C durante 5 minutos. Tendo-se confirmado o destacamento das colónias e a separação das CEEs entre si, as células foram ressuspensas na própria tripsina por 4-5 pipetagens, transferidas para um tubo de centrifuga com 6,5 mL de meio de cultura pré-aquecido para parar a ação da tripsina e novamente homogeneizadas. O frasco foi ainda lavado com mais 3 mL de meio de cultura para recolher as células remanescentes. Após uma centrifugação a 200 ×g durante 5

minutos e eliminação do sobrenadante por aspiração, o precipitado celular foi cuidadosamente ressuspenso em 1 mL de meio de cultura para CEEs, por pipetagens sucessivas com pipeta de vidro. Nesta fase é muito importante conseguir uma suspensão de células individualizadas por causa do processo de congelação. De seguida adicionou-se 1 mL de meio de congelação para CEEs (2× concentrado), preparado no próprio dia e pré-arrefecido, e homogeneizou-se pipetando mais 5-6×. A suspensão celular obtida de cada T25 foi depois dividida por dois criotubos que foram colocados numa caixa de esferovite previamente arrefecida e armazenada a -80°C durante uma noite. No dia seguinte, para armazenamento a longo prazo, os criotubos foram transferidos para um contentor de azoto líquido.

Este procedimento permitiu a criopreservação de 4 criotubos de cada clone recombinante de CEEs.

3.5.8. Preparação das CEEs para agregação

As linhas de CEEs a serem usadas para formarem quimeras por agregação devem ser mantidas em condições ótimas de crescimento. As células devem ser passadas pelo menos uma vez depois de descongeladas (de preferência para placas gelatinizadas), antes de serem usadas em agregações. O objectivo é produzir agregados de oito a quinze células, não muito compactos, mesmo antes das agregações.

Quatro dias antes do dia da agregação, as CEEs de um criotubo (12,5 cm²) foram descongeladas para dois poços (19,2 cm²) de uma placa de 6 poços, gelatinizados e com *feeders*. Dois dias depois, as células dos dois poços foram passadas na razão de 1:30 e 1:60 para placas de 100 mm gelatinizadas, sem *feeders*, de acordo com o procedimento descrito em 3.5.3.6. Dois dias depois, no dia da agregação, após a preparação dos embriões, verificou-se por observação no microscópio invertido, qual das duas diluições produziu placas com as condições acima descritas.

Nessas placas, o meio foi removido por aspiração e as colónias de CEEs foram lavadas uma vez com PBS. De seguida foi adicionado 3 mL de tripsina-EDTA a cada placa de 100 mm e aguardou-se cerca de 3 minutos, com a placa à temperatura ambiente. Durante esse período de tempo a placa foi agitada gentilmente para promover o destacamento físico dos agregados celulares. Após confirmação, por observação no microscópio invertido, que as células tinham começado a destacar-se em grupos/agregados, a ação da tripsina foi interrompida por adição, sem homogeneização, de 10 mL de meio de cultura para CEEs pré-aquecido. A suspensão celular não foi homogeneizada uma vez que o objectivo é manter os agregados celulares coesos. As placas foram mantidas à temperatura ambiente na câmara de fluxo laminar e os agregados celulares foram usados entre uma a duas horas após este procedimento.

3.5.9. Indução de superovulação

Uma das formas de obter oócitos fertilizados é estabelecer cruzamentos naturais, isto é, cruzamentos em que o momento da ovulação e da fertilização são controlados por condições ambientais. Nos murganhos, as fêmeas mantidas num ciclo de luz-escuro constante tendem a ovular uma vez a cada 4-5 dias, 3-5 horas após o início do período de escuro. Os machos férteis, mantidos nas mesmas condições, irão copular com as fêmeas em estro a meio do período escuro. Isto significa que a fertilização ocorre 1-2 horas após a ovulação (Hogan, Beddington, Costantini, & Lacy, 1994b).

Regra geral são utilizadas fêmeas com 7-8 semanas de idade e machos com mais de 12 semanas de idade que tenham sido previamente isolados e estimulados por outras fêmeas ou por material de cama proveniente de caixas de fêmeas. Cada macho deve ser junto com uma a duas fêmeas cerca de 2 horas antes do início do período escuro. Na manhã seguinte dever-se-á verificar a existência de um rolhão vaginal em todas as fêmeas. Este rolhão vaginal consiste nas proteínas do fluído seminal do macho que coagulam quando em contacto com o ar, e pode ser facilmente observado na vulva das fêmeas cobertas. Se as fêmeas não tiverem o seu ciclo reprodutivo sincronizado, cerca de 25% irão ser cobertas e terão 7-13 oócitos fertilizados, dependendo da estirpe (Hogan, Beddington, Costantini, et al., 1994b).

Experiências que requeiram um grande número de embriões em fase de pré-implantação e no sentido de otimizar o número de fêmeas utilizadas, é possível aumentar o número de oócitos que são ovulados num só ciclo, através da administração de gonadotrofinas, isto é, através da indução de superovulação (Hogan, Beddington, Costantini, et al., 1994b).

As gonadotrofinas utilizadas são a gonadotrofina do soro da égua gestante (PMSG – *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) que mimetiza a ação da hormona folículo-estimulante (FSH – *Follicular Stimulating Hormone*) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG – *human Chorionic Gonadotropin*) que mimetiza a ação da hormona luteinizante. Deste modo, a administração de PMSG sincroniza o ciclo reprodutivo das fêmeas, induzindo o desenvolvimento folicular simultâneo, e a hCG induz a rutura dos folículos desencadeando a ovulação. Normalmente a ovulação ocorre 10-13 horas após a administração da hCG (Hogan, Beddington, Costantini, et al., 1994b).

A indução eficiente da superovulação em murganhos depende de diversos fatores: estirpe de murganho utilizada, idade e peso das fêmeas, dose e momento da administração de gonadotrofinas.

A experiência prévia do laboratório onde foram desenvolvidos os trabalhos, indica que a melhor idade para a indução da superovulação em fêmeas da estirpe CD-1 são as 6-8 semanas, altura em que o peso vivo médio é de cerca 20 g.

A dose recomendada de PMSG é de 5-10 IU administradas por via intraperitoneal. Esta gonadotrofina é fornecida sob a forma liofilizada e deverá ser ressuspensa em PBS estéril ou em soro fisiológico (0,9% NaCl) na concentração de 50 IU/mL, distribuída por alíquotas e armazenada a -20°C.

A dose recomendada de hCG é de 2,5-5 IU administradas por via intraperitoneal também. Esta gonadotrofina é fornecida sob a forma liofilizada e deve ser ressuspensa em água estéril na concentração de 500 IU/mL, distribuída por alíquotas de 100 µL e armazenada protegida da luz a -20°C. Antes da administração, uma alíquota é diluída em 900 µL de soro fisiológico estéril para uma concentração final de 50 IU/mL.

O momento em que a hCG é administrada relativamente à PMSG e o ciclo de luz-escuro afetam quer a uniformidade do desenvolvimento quer o número de oócitos/embriões que depois são obtidos. Para a maioria das estirpes, um intervalo de 42 a 48 horas entre ambas as administrações é o que permite obter melhores rendimentos.

No presente trabalho foi utilizado um ciclo de luz-escuro 12h-12h, iniciando o período de luz às 5 a.m. e terminando às 5 p.m. Cinco dias antes da recolha de embriões na fase de mórula de oito células (2,5 dpc), às 5 p.m., a cada fêmea foi administrado por via intraperitoneal 200 µL (10 IU) de uma solução de PMSG (Sigma-Aldrich G4877) preparada tal como descrito acima, na concentração de 50 IU/mL. 44 horas depois da administração de PMSG, à 1 p.m., foi administrado, por via intraperitoneal 200 µL (10 IU) de uma solução de hCG (Sigma-Aldrich C1063) preparada tal como descrito acima, na concentração de 50 IU/mL. Nesse mesmo dia, às 3 p.m., cada fêmea induzida foi junta com um macho fértil da mesma estirpe, previamente isolado e estimulado tal como descrito acima. No dia seguinte, antes das 11 a.m., foi verificada a presença do rolhão vaginal. Este dia é marcado como 0,5 dpc pois assume-se que a cópula terá ocorrido a meio do período noturno anterior. A fêmeas com rolhão vaginal foram guardadas para serem sacrificadas e os seus embriões recolhidos 2 dias depois.

As fêmeas induzidas (superovuladas) que não copularam foram isoladas durante cerca de três meses, até voltarem a ter o ciclo éstrico regularizado. Como já não podem voltar a ser superovuladas, normalmente são usadas como recetoras a partir do fim deste período.

Foram induzidas fêmeas das estirpes CD-1 e NMRI, com 6 a 9 semanas de idade e com 20-30 g de peso vivo.

A escolha da estirpe dadora de embriões é importante. Regra geral é escolhida uma estirpe com um repórter genético diferente do presente no fundo genético das CEEs. Este repórter é frequentemente um polimorfismo associado à cor da pelagem ou um alelo que codifica uma proteína fluorescente expressa ubiquamente ou no embrião ou nas CEEs. Só desta forma é

possível distinguir quais as células/tecidos da quimera derivam das CEEs ou do embrião recetor (Eakin & Hadjantonakis, 2006).

3.5.10. Colheita de embriões no estágio de mórula de oito células

Os dois métodos mais comumente utilizados para produzir murganhos quiméricos a partir de CEEs modificadas, são a injeção destas no blastocélio de um embrião recetor no estágio de blastocisto ou a sua agregação com um embrião recetor no estágio de mórula. A injeção do blastocisto permite ao investigador seleccionar rigorosamente cada célula embrionária estaminal modificada que é introduzida e assim seleccionar apenas aquelas que têm maior probabilidade de colonizar o animal quimérico eficientemente; contudo é uma técnica que requer equipamento especializado, de manutenção e calibração dispendiosa, e tecnicamente mais exigente, requerendo muita perícia e anos de treino. A agregação, por outro lado, não requer equipamento especializado, é barata e pode ser aprendida rapidamente com alguma facilidade; a principal desvantagem é a incapacidade de seleccionar as CEEs individualmente, podendo resultar na redução da qualidade das quimeras, uma questão particularmente problemática no caso de serem usadas CEEs com muitas passagens. Aparte estas diferenças, a escolha da técnica é sobretudo uma questão de preferência individual (Eakin & Hadjantonakis, 2006).

As CEEs podem-se agregar a embriões de oito células e ser incorporadas nas quimeras resultantes. As quimeras de agregação originais foram obtidas por agregação de embriões diplóides em fase pré-blastocisto (mórula compacta) e verificou-se que, neste caso, os embriões quiméricos resultantes apresentavam contribuições de ambos os embriões diplóides usados em todas as linhas celulares na fase de pré-implantação: epiblasto, endoderme primitiva e trofoectoderme e nos tecidos delas derivados. Quando CEEs são agregadas com embriões de oito células, o resultado é diferente devido ao potencial limitado das CEEs para contribuir para as linhagens derivadas da trofoectoderme e endoderme primitiva; neste caso as CEEs apenas têm capacidade para contribuir para as linhagens derivadas do epiblasto, ou seja, o embrião próprio, o âmnio, a mesoderme do saco vitelino e a alantóide (Andras Nagy & Rossant, 2000). Dois dias após a observação do rolhão vaginal (2,5 dpc ou 55-60 horas *post coitum*), na manhã do dia da agregação, as fêmeas superovuladas foram sacrificadas por deslocamento cervical.

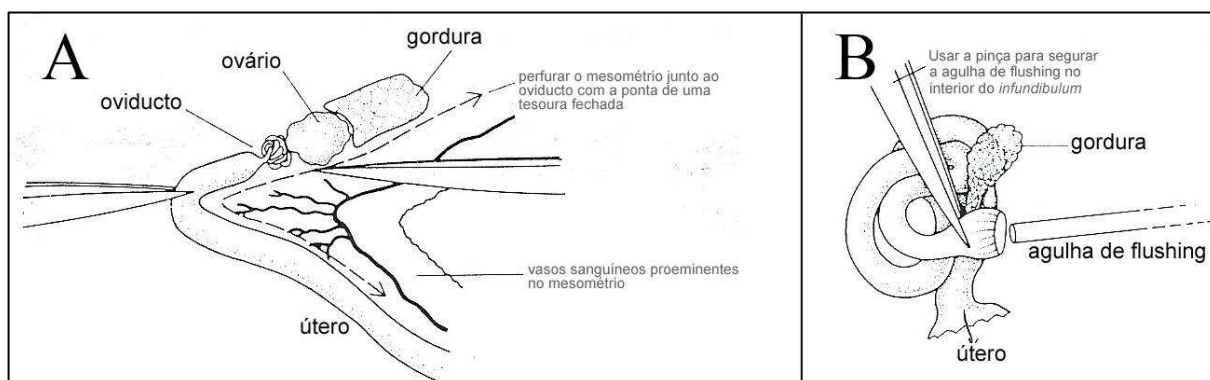
Nesta fase, estão presentes no oviduto embriões de 2 a 8 células que já perderam as células do *cumulus*, sendo possível recolhê-los por lavagem do oviduto com um pequeno volume de meio de cultura para embriões (Hogan, Beddington, Costantini, et al., 1994b).

Após saturar a zona abdominal com etanol 70%, foi realizada uma abertura transversal da pele, imediatamente abaixo da região do diafragma, com uma tesoura de dissecação. Por tração dos dois topos da incisão, na direcção da cabeça e da cauda, expôs-se toda a parede muscular

abdominal. Com uma tesoura cirúrgica fina realizou-se uma incisão longitudinal na linha média da parede muscular abdominal e peritoneu e expôs-se todos os órgãos abdominais e pélvicos. Realizando tração com uma pinça atraumática no depósito de tecido adiposo presente no polo cranial do ovário, expôs-se e realizou-se uma perfuração do mesométrio com a tesoura cirúrgica fechada (Figura 20A). De seguida, realizando um corte com a tesoura cirúrgica no corno uterino, cerca de 0,5 cm abaixo do oviduto, os ovários juntamente com o respetivo oviduto e porção inicial do corno uterino foram recolhidos para uma placa de 60 mm (TPP®, 93060) com uma gota (50-70 µL) de meio M2 (EmbryoMax®, Merck Millipore, MR-015P-D) aquecido a 37°C sobre uma manta de aquecimento (MTG GmbH, 12055/0202). O meio M2 contém tampão HEPES, o que permite a manuseamento dos embriões fora de uma estufa (com concentração controlada de CO₂), sem que o pH seja alterado por isso.

Sob a lupa de dissecção, a abertura do oviduto (*infundibulum*) foi localizada (Figura 20B) e segurando esta extremidade com uma pinça atraumática (Dumont No.5), foi introduzida uma agulha de 30G × ½” (BD Microlance™ 3, 304000), cuja ponta foi previamente cortada em ângulo reto e boleada, acoplada a uma seringa de 1 mL com meio M2.

Figura 20 - Representação esquemática do ovário, oviduto e útero. (A) Perfuração do mesométrio. **(B)** Introdução da agulha de *flushing* no *infundibulum*. Traduzido e adaptado de (Hogan, Beddington, Costantini, & Lacy, 1994).



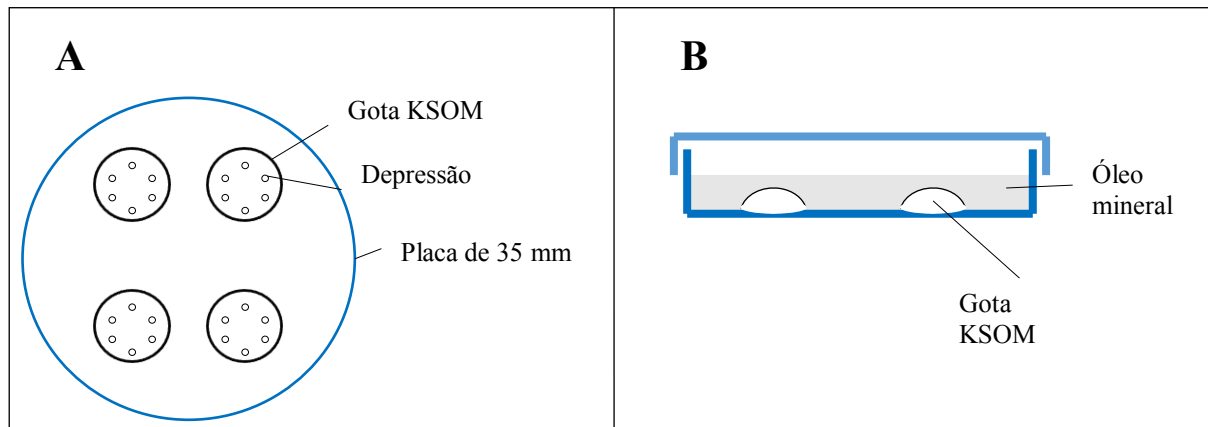
A lavagem (*flushing*) do oviduto foi realizada injetando cerca de 0,5 mL de meio M2. Com um pipetador Gilson P10, os embriões foram transferidos da placa de 60 mm para uma gota (70 µL) de meio M2 numa placa de 4 anéis (Greiner Bio-one, CELLSTAR®, 627170). De seguida procedeu-se à lavagem e seleção dos embriões no estágio de mórula de oito células, passando sucessivamente os embriões por 3 gotas (70 µL) de meio M2. As placas de 4 anéis com os embriões selecionados e lavados permaneceram sob a manta de aquecimento, a 37°C, até serem preparados para a agregação.

3.5.11. Agregação das mórulas de oito células com CEEs recombinantes homólogas

3.5.11.1. Preparação da placa de agregação

No dia da agregação, antes de se recolherem os embriões no estágio de mórula de 8 células, foram preparadas as placas de agregação de modo a assegurar o equilíbrio ácido-base e a estabilidade da temperatura do meio de cultura dos embriões.

Figura 21 - Representação esquemática da placa de agregação. (A) Vista superior. (B) Vista lateral.



Em placas de 35 mm (Falcon[®], 353001) foram distribuídas 4 gotas (50 µL cada) de meio KSOM (EmbryoMax[®], Merck Millipore, MR-020P-5F) ressuspensão no próprio dia. De seguida adicionou-se cerca de 1,5 mL de óleo mineral (Sigma-Aldrich, M-8410) de modo a cobrir a superfície das gotas e assim evitar eventuais perdas (e alteração da concentração do meio) por evaporação durante a manipulação dos embriões (Figura 21B). Em cada gota foram realizadas 6 depressões, com uma agulha de agregação (BLS[®], DN-09) (Figura 21A). Aplicando a ponta da agulha de agregação com uma força uniforme contra a base da placa e fazendo movimentos circulares foram criadas depressões com superfície lisa e com cerca de 300 µm de diâmetro. As placas assim preparadas foram guardadas na incubadora a 37°C, 5% CO₂ até os embriões estarem prontos para distribuição pelas depressões.

3.5.11.2. Remoção da zona pelúcida às mórulas

A capacidade das CEEs serem incorporadas por embriões de oito células após a agregação parece depender essencialmente da compatibilidade entre as moléculas de adesão nas células dadoras e embriões recetores. Uma dessas moléculas é a E-caderina (Andras Nagy & Rossant, 2000).

Para que as moléculas de adesão das CEEs recombinantes tenham acesso às moléculas de adesão presentes nas células do embrião no estágio de mórula, é necessário remover a *zona pellucida* (ZP), uma matriz extracelular especializada que circunda a membrana plasmática dos oócitos mamíferos.

Para remover a *zona pellucida* utilizou-se uma solução salina acidificada.

Numa placa de 100 mm foram colocadas duas linhas, cada uma com 4 gotas (30 μ L), de meio M2, seguidas de três linhas, cada uma também com 4 gotas, de meio ácido de Tyrode's (Sigma-Aldrich®, T1788). Completou-se a placa com mais duas linhas (de 4 gotas cada) de meio M2.

Todo o trabalho seguinte foi desenvolvido observando os embriões sob a lupa de dissecação, colocada no interior da câmara de fluxo horizontal.

Os embriões no estágio de mórula de 8 células, já lavados, na placa de 4 anéis (veja-se 3.5.10.) foram transferidos com pipetador Gilson P10 num volume de 5 μ L para a primeira gota de meio M2, da primeira linha. Regra geral foram transferidos 10 embriões de cada vez.

Trabalhando em coluna, passaram-se os embriões sucessivamente nas diferentes gotas. Depois da segunda gota de meio M2, os embriões foram transferidos para a primeira gota de solução ácida de Tyrode's onde permaneceram cerca de 30 segundos. No final desse tempo foram transferidos para a segunda gota de solução ácida de Tyrode's onde permaneceram até se verificar a dissolução da *zona pellucida* da maioria dos embriões. Aqueles que nesta segunda gota de ácido já não têm zona, foram transferidos para a terceira gota de meio M2. Os que ainda tinham zona foram transferidos para a terceira gota de ácido e aguardou-se até à dissolução completa, altura em que foram imediatamente transferidos para a terceira gota de meio M2. É importante não deixar o ácido atuar tempo demais senão pode ocorrer desagregação dos blastómeros. Os embriões sem zona, não devem permanecer muito tempo na terceira gota de meio M2 uma vez que se tornam bastante adesivos (“*sticky*”). Estes foram depois lavados mais uma vez na quarta gota de meio M2 antes de serem transferidos para uma gota de meio KSOM numa placa de 35 mm. Nessa placa os embriões foram ainda lavados mais duas vezes por passagem em outras duas gotas de meio KSOM. Os embriões sem *zona pellucida*, já lavados, permaneceram na última gota de meio KSOM da placa de 35 mm, dentro da incubadora a 37°C, 5% CO₂, até serem distribuídos pelas depressões da placa de agregação, um processo que ocorreu no máximo no prazo de uma hora pois, como já foi referido, sem *zona pellucida* os embriões tornam-se muito adesivos.

O processo foi repetido com os restantes embriões, usando novas gotas de ácido de Tyrode's para cada grupo de embriões.

3.5.11.3. Montagem das agregações

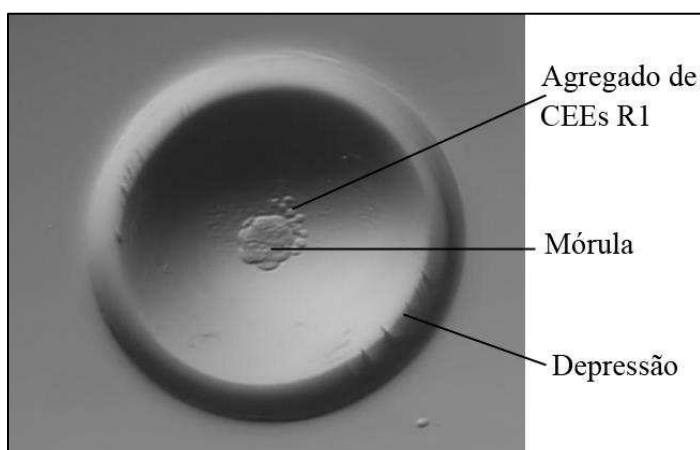
Trabalhando sob a lupa de dissecação, 6 embriões sem *zona pellucida* foram transferidos da última gota de meio KSOM (da placa onde fizeram as lavagens finais, veja-se 3.5.11.2.), com um pipetador Gilson P10, num volume de 5 μ L, para o centro de uma das quatro gotas de meio KSOM da placa de agregação. De seguida foi distribuído um embrião por depressão também

por pipetagem com um pipetador Gilson P10. Repetiu-se este procedimento para as outras três gotas de meio KSOM. Cada placa de agregação ficou assim com 24 embriões, cada um na sua depressão. A placa de agregação foi guardada na incubadora, a 37°C, 5% CO₂, enquanto se distribuíam os restantes embriões por outras placas de agregação.

Depois de distribuir todos os embriões, as células estaminais embrionárias, preparadas tal como descrito em 3.5.8, foram observadas sob a lupa de dissecação e apenas os agregados de 10-15 células foram selecionados e aspirados com um pipetador Gilson P10 para uma placa de 60 mm com 2 mL de meio KSOM. Após uma lavagem inicial as células foram lavadas mais duas vezes em meio KSOM e permaneceram neste meio até serem distribuídas pelas depressões da placa de agregação já com um embrião cada.

Trabalhando sob a lupa de dissecação, selecionaram-se sete a oito agregados de CEEs que foram aspirados num volume de 5 µL com o pipetador Gilson P10 para o centro de uma das quatro gotas de meio KSOM na placa de agregação. De seguida foi distribuído um agregado por depressão também por pipetagem com um pipetador Gilson P10. Neste passo é preciso algum cuidado para não remover o embrião já presente na depressão por ação física do fluxo gerado pela ejeção do volume em que é transportado o agregado de CEEs. Depois de distribuir agregados de CEEs por todas as depressões, observou-se atentamente toda a placa de agregação para confirmar que em todas as depressões ficou apenas um embrião e um agregado de 10-15 CEEs (Figura 22).

Figura 22 - Depressão da placa de agregação com uma mórula e um agregado de células estaminais embrionárias R1 lado a lado.



As placas de agregação assim montadas foram colocadas na incubadora a 37°C, 5% CO₂ durante cerca de 24-26 horas, o tempo necessário para que os embriões agreguem as CEEs e evoluam para o estágio de blastocisto.

3.5.11.4. Recolha dos embriões agregados

No dia seguinte à agregação, cerca de 24 a 26 horas após a montagem da última placa de agregação, todos os embriões foram observados cuidadosamente sob o microscópio invertido. Apenas os embriões que agregaram as CEEs (deduzido pela ausência do agregado na depressão) e que evoluíram para blastocisto ou mórula compacta foram selecionados para transferência uterina.

Trabalhando sob a lupa de dissecção, colocada no interior da câmara de fluxo horizontal, os embriões resultantes da agregação foram transferidos das depressões da placa de agregação para uma gota (120 µL) de meio M2 numa placa de 4 anéis, por pipetagem com um pipetador Gilson P10. Como nesta primeira gota permanecem alguns vestígios do óleo mineral presente na placa de agregação, os embriões foram lavados por passagem em mais 3 gotas de meio M2 na mesma placa de 4 anéis.

Os embriões resultantes da agregação, já lavados, em meio M2, foram mantidos sob a manta de aquecimento a 37°C até serem transferidos para o útero das fêmeas pseudogestantes.

3.5.12. Obtenção de fêmeas de murganho pseudogestantes

Os embriões resultantes da agregação foram transferidos para fêmeas pseudogestantes das estirpes CD-1 ou NMRI.

É importante selecionar fêmeas em bom estado de saúde, de preferência primíparas (já ficaram gestantes pelo menos uma vez) e que tenham dado provas de serem boas mães. Idealmente deverão ter entre 8 a 12 semanas e 30 a 35g de peso vivo.

Os murganhos são uma espécie ovuladora espontânea. O estado de pseudogestação desenvolve-se em fêmeas que, em estro, são cobertas por machos vasectomizados (estéreis). Após a cópula, o trato reprodutivo das fêmeas cobertas (com rolhão (*plug*) vaginal) fica recetivo aos embriões transferidos, apesar de os seus próprios oócitos não fertilizados degenerarem. Uma fêmea pseudogestante não reinicia o seu ciclo reprodutivo normal nos 11 dias seguintes à cópula com o macho vasectomizado.

Os machos vasectomizados utilizados foram obtidos no laboratório (veja-se 3.5.13.).

Como as fêmeas, potenciais recetoras, não foram sincronizadas, o número de fêmeas usadas foi cinco a dez vezes o número de fêmeas recetoras que se pretendia obter. Em teoria ¼ das fêmeas deveria ter rolhão vaginal na manhã seguinte, no entanto, na realidade, verifica-se que este valor é muito mais baixo, tendo sido por isso necessário utilizar até cerca de 60 fêmeas em cada sessão.

Regra geral, por volta das 4 p.m. do dia em que se verificou a presença de rolhão vaginal no grupo de fêmeas superovuladas, uma ou duas fêmeas foram colocadas com um macho

vasectomizado e a presença de rolhão vaginal avaliada na manhã seguinte. As fêmeas com rolhão vaginal foram separadas e guardadas até ao dia da transferência uterina. As fêmeas sem rolhão vaginal foram utilizadas para recetoras em sessões seguintes.

As fêmeas pseudogestantes apresentam assim um desfaseamento de um dia relativamente aos embriões agregados, no dia da receção.

De um modo geral, os embriões podem ser transferidos para um hospedeiro síncrono, mas como a manipulação e cultura *in vitro* têm o efeito de atrasar o desenvolvimento embrionário, o método mais eficiente é a transferência de embriões para hospedeiras que estão assíncronas um dia. Assim, blastocistos com 3,5 dpc são transferidos para o útero de fêmeas pseudogestantes com 2,5 -3 dpc. Uma maior assincronia pode ser tolerada, desde que sejam sempre os embriões que estejam mais avançados.

Deste modo é dado ao embrião tempo para retomar o seu desenvolvimento antes de ser exposto às condições favoráveis à implantação (Hogan, Beddington, Costantini, et al., 1994b).

3.5.13. Vasectomização de murganhos da estirpe CD-1

Os machos vasectomizados utilizados foram obtidos no laboratório. Para tal, 3 grupos de 15 machos da estirpe CD-1, com 5-6 meses de idade e 35 a 40 g de peso vivo, que já tinham dado provas da sua fertilidade, foram sujeitos a um procedimento cirúrgico que consiste na remoção de um pequeno segmento dos dois ductos deferentes resultando assim na impossibilidade de fecundação sem, contudo, ter qualquer efeito na capacidade de copular.

Começou-se por administrar 450 µL de avertina a 2,5% (anexo I) por via intraperitoneal. Quando os animais não apresentavam qualquer reflexo, foi realizada a tricotomia da região abdominal entre os dois últimos mamilos e a pele foi bem limpa com etanol a 70% (v/v). Com uma tesoura de dissecção fina foi realizado um corte transversal na pele, com cerca de 2 cm, a meio de uma linha imaginária que une as duas articulações do joelho. Tendo exposta a parede abdominal foi realizada uma incisão com cerca de 1 cm na parede muscular abdominal. Um testículo de cada vez foi exteriorizado através dessa abertura única, por tração do depósito de tecido adiposo associado. Em cada testículo exteriorizado foi realizada uma ansa de ducto deferente, segura por uma pinça atraumática, de modo a remover essa porção do ducto com um eletrocautério. Após recolocação dos testículos no interior da cavidade abdominal, a parede muscular abdominal, juntamente com a pele, foi encerrada com uma sutura por pontos simples com fio de seda (4/0; Aesculap®, B-Braun, Silkam®, C0765201). Os machos vasectomizados foram monitorizados até acordarem.

Cerca de dez dias após a cirurgia foram realizados cruzamentos de teste com fêmeas de refugo. Estes cruzamentos permitiram confirmar que os machos vasectomizados mantinham a

capacidade de cópula. 17 dias após a observação de *plug* nestas fêmeas a verificação de que não tinham ficado gestantes confirmou a esterilidade dos machos intervencionados.

3.5.14. Transferência uterina dos embriões agregados

Como foi referido atrás, no presente trabalho, os embriões no estágio de mórula compacta (tardia) ou blastocisto (3,5 dpc) foram transferidos para o útero de fêmeas pseudogestantes com 2,5 dpc.

No dia da transferência, antes de recolher os embriões resultantes da agregação, foram preparadas as pipetas de transferência. Estas pipetas deverão ter um diâmetro interno suficiente para manter e segurar apenas um embrião por secção e uma abertura pequena o suficiente para entrar com o mínimo de lesão da parede uterina, mas que ao mesmo tempo não deve conduzir a deformação ou dano do embrião.

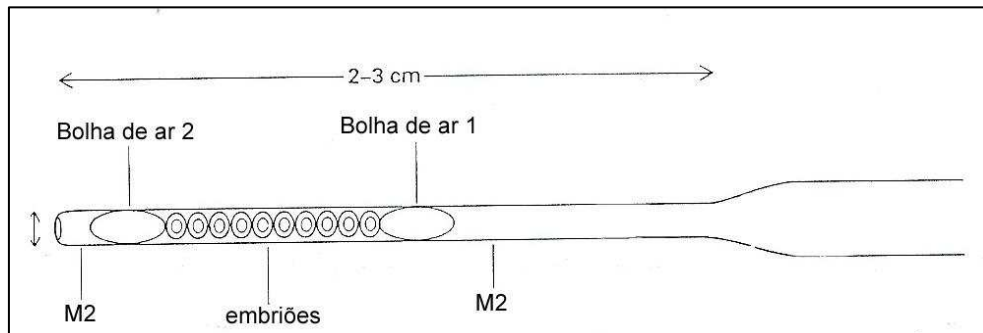
Sobre uma chama baixa de um bico de Bunsen aqueceu-se o centro da região mais estreita de uma pipeta de Pasteur de vidro (Volac®, D812) autoclavada. Quando o vidro ficava laranja então aplicou-se tração uniforme em sentidos opostos nas extremidades da pipeta de modo a afilar o vidro quente. De seguida, partiu-se a pipeta com uma ponta de diamante, cerca de 5 cm abaixo do colo da pipeta de Pasteur e passou-se a ponta partida rapidamente pela chama para eliminar arestas, mas sem a fechar. Repetiu-se este procedimento para várias pipetas de Pasteur de vidro e no final seleccionaram-se apenas as melhores pipetas de transferência por observação sob a lupa de dissecção da ponta afilada sem arestas e permeável. O diâmetro interno da pipeta de transferência deverá ser de cerca 110-130 µm.

Para a transferência uterina, as fêmeas pseudogestantes, uma de cada vez, foram anestesiadas por administração intraperitoneal de 400 µL de avertina a 2,5% (v/v). Enquanto se aguardava pelo efeito da anestesia, a pipeta de transferência foi preparada. Para tal, utilizando um pipetador de boca (Reproline-medical GmbH, 441291) acoplado à pipeta de transferência aspirou-se uma gota de meio M2, seguida de uma pequena bolha de ar, 20 a 30 embriões resultantes da agregação em meio M2, ar novamente e por fim uma gota de meio M2 (Figura 23). A pipeta de transferência assim montada foi colocada sobre um pedaço de plasticina na base da lupa de dissecção, enquanto se preparava a fêmea recetora.

Já sob o efeito da anestesia, cada fêmea recetora foi colocada em decúbito ventral sobre um monte de toalhas de papel na base da lupa de dissecção e o seu dorso foi ensopado com etanol a 70%. Após tricotomia de uma região retangular no dorso, e assepsia da pele com etanol a 70%, foi realizado um corte transversal, com cerca de 1 cm, ao nível da primeira vértebra lombar, com uma tesoura de dissecção. Deslizando a abertura da pele no sentido do pólo caudal de um dos rins, foi possível observar o depósito de tecido adiposo associado ao polo cranial do ovário

através do peritoneu. Nesse local foi realizada uma abertura de cerca 0,5 cm com uma tesoura cirúrgica fina (diferente da utilizada para fazer o corte na pele). Através da abertura do peritoneu exteriorizou-se o ovário, oviduto e porção inicial do corno uterino por tração com uma pinça atraumática no depósito de tecido adiposo. Para estabilizar e manter o ovário e porção inicial do corno uterino fora da cavidade abdominal, foi colocada uma pinça tipo Bulldog Serrefine (F.S.T[®], 18050-28) no depósito de tecido adiposo.

Figura 23 - Representação esquemática da pipeta de transferência já montada



Segurando o útero com uma pinça Dumont No5, atraumática, com uma agulha hipodérmica de 26G realizou-se uma perfuração num local da parede uterina onde não eram visíveis vasos sanguíneos, introduzindo a agulha através das camadas musculares da parede uterina paralelamente ao eixo maior do corno uterino.

Mantendo a tração com a pinça Dumont e não perdendo de vista o local onde se fez a perfuração, largou-se a agulha hipodérmica e apanhou-se a pipeta de transferência (colocando primeiro o pipetador de boca na boca e segurando depois a pipeta de transferência na mão direita) que foi introduzida 2-3 mm no interior do lúmen uterino, paralelamente ao eixo maior, através da perfuração realizada previamente. Tendo-se confirmado que a agulha de transferência se encontrava no interior do útero, os embriões e bolhas de ar marcadoras foram expelidos expirando de forma controlada pelo pipetador de boca. De seguida, observou-se a pipeta de transferência sob a lupa de dissecação para confirmar que todos os embriões tinham saído.

Retirou-se a pinça tipo Bulldog Serrefine e recolocou-se o ovário e o útero no interior da cavidade abdominal através da abertura do peritoneu. Quando foram realizadas transferências bilaterais, através da mesma abertura da pele, foi realizado mais um corte do peritoneu, na região do polo caudal do outro rim, e repetiram-se todos os procedimentos descritos acima.

As incisões do peritoneu foram encerradas por um ponto simples com fio de sutura absorvível (5/0; Aesculap[®], B-Braun, Novosyn[®], C0068507) e a incisão da pele foi encerrada por uma sutura de 3 a 4 pontos simples com fio de sutura não absorvível (4/0; Aesculap[®], B-Braun, Silkam[®], C0765201). As fêmeas recetoras foram mantidas sob a manta de aquecimento a 37°C

e monitorizadas até recuperarem da anestesia. Depois foram mantidas individualmente em caixas com material de ninho (algodão e papel).

Uma vez que a gestação do murganho dura 19-20 dias e foram transferidos embriões com 3,5 dpc, a partir do 15º dia e até ao 17º dia após a transferência, as fêmeas foram monitorizadas duas vezes ao dia para tentar acompanhar o momento do nascimento das quimeras. Apesar de serem transferidos 15 a 20 embriões por corno uterino nem todos conseguem implantar-se e podem verificar-se taxas de sucesso inferiores a 30%, pelo que, na melhor das hipóteses, dos 30-40 embriões transferidos, podem implantar-se apenas 9 a 12 e destes frequentemente menos de 50% chegam a termo. Quando apenas um ou dois embriões chegam a termo podem ficar demasiado grandes para nascer por via vaginal ou podem nem chegar a desencadear o trabalho de parto.

Ao 17º dia após a transferência, as fêmeas recetoras que não pariram naturalmente foram sacrificadas e o útero foi aberto para verificar a presença de fetos de termo. Quando existiam fetos de termo vivos, estes eram colocados com mães adotivas (fêmeas que tinham parido no mesmo dia).

3.5.15. Análise das quimeras

O marcador genético mais conveniente e evidente de quimerismo é a cor da pelagem. Combinações quiméricas de estirpes que diferem apenas num *locus* para a cor da pelagem permitem a apreciação visual simples do grau de contribuição de cada componente quimérico para o tecido, podendo ser avaliado em termos da proporção de pelagem que expressa o alelo das CEEs. Esta avaliação dos animais quiméricos é necessariamente subjetiva, mas, de um modo geral, o grau de quimerismo da coloração da pelagem de um determinado animal correlaciona-se com o grau de contribuição das CEEs modificadas para as células da linha germinativa. Se um clone de CEEs modificadas contribui mais do que 50-60% para a coloração da pelagem de um grupo de quimeras formadas com esse clone, então é bastante provável que também contribua para as células da linha germinativa na mesma proporção. Pelo contrário, se raramente contribui mais do que 5-10% para a coloração da pelagem do grupo de quimeras a que deu origem, a probabilidade de transmissão na linha germinativa é inerentemente pequena (Papaioannou & Johnson, 2000).

Quando se fazem agregações de células estaminais embrionárias R1 (*agouti*) com mórulas de ratinhos da estirpe CD-1 ou NMRI (*albino*), as crias que nascem podem ter zonas com pelo de duas cores possíveis (*agouti* ou *albino*), que refletem o seu genótipo.

A percentagem do corpo que estiver coberta por pelagem *agouti* numa quimera reflete geralmente a percentagem de contribuição da linha R1 para esse organismo. Obtêm-se desde

quimeras só com uma mancha *agouti* em todo o corpo até animais com pelagem totalmente *agouti*. Esta combinação R1-CD-1 ou R1-NMRI permite a determinação da ocorrência de contribuição das CEEs para a formação do organismo logo no dia de nascimento, pois os olhos escuros (não albinos) são visíveis através das pálpebras fechadas. Uma quimera, por mais fraca que seja a contribuição das CEEs, tem sempre olhos escuros.

Outro efeito fenotípico do quimerismo é a diferente proporção de machos e fêmeas. Como já foi referido, as células estaminais embrionárias R1 são derivadas de embriões macho e por isso são XY. Uma das razões para se usarem CEEs derivadas de embriões macho prende-se com o fato de estar descrito que a sua utilização na agregação conduz à obtenção de uma maior proporção de quimeras com fenótipo macho, podendo assim produzir maior descendência do que uma só fêmea, no mesmo período de tempo. As CEEs derivadas de embriões fêmeas são instáveis e por vezes, por razões que ainda se desconhecem, perdem um dos cromossomas X e tornam-se XO (Papaioannou & Johnson, 2000).

A tendência de género nas quimeras, a favor do fenótipo macho, é uma observação frequente quando se usam CEEs XY. Os embriões recetores não são selecionados de acordo com o género. Assim, em combinação com um embrião fêmea (XX), regra geral é gerada uma quimera fértil com fenótipo macho. Esta conversão do sexo provavelmente ocorre quando um número suficiente de CEEs XY colonizam os diversos tecidos que determinam o género no embrião em desenvolvimento dada a natureza dominante da testosterona que atua sistemicamente. Contudo, esta conversão de sexo nas quimeras XX-XY, nem sempre é completa e ocasionalmente resulta em infertilidade; apesar de fenotipicamente se assemelharem a um macho (devido ao efeito da testosterona) não produzem gâmetas viáveis.

Em combinação com um embrião macho (XY) é sempre gerada uma quimera fértil com o fenótipo macho, que pode ou não transmitir a mutação à descendência, dependendo se houve um número suficiente de CEEs a colonizar os tecidos que determinam o género durante o desenvolvimento do embrião.

As quimeras em que a conversão de sexo é completa são as melhores para iniciar a nova linha. Estas apenas irão transmitir o genótipo (XY) das CEEs modificadas, uma vez que as células XX (derivadas do embrião) não têm capacidade para iniciar a espermatogénese.

Contudo, está descrito que também pode ocorrer transmissão do genótipo das CEEs (XY) modificadas em quimeras que se apresentam fenotipicamente como fêmeas. Uma vez que as células XY (derivadas das CEEs) não têm capacidade para iniciar a oogénese na quimera fêmea, uma hipótese que explica este fenómeno é a perda de parte ou todo o cromossoma Y das CEEs, resultando efetivamente em células XO que têm capacidade para gerar oócitos que transmitem a mutação à descendência.

Assim, foi realizado um registo do número, sexo e grau de quimerismo de todos os animais nascidos das fêmeas recetoras. Tal como foi referido, o grau de quimerismo foi apreciado de uma forma subjetiva.

3.5.16. Determinação da contribuição das CEEs recombinantes nas células da linha germinativa das quimeras

Por norma os machos (e também as fêmeas) quiméricos são cruzados com fêmeas (ou machos, consoante o caso) para aferir a contribuição das CEEs nas células da linha germinativa (que dão origem aos gâmetas).

As quimeras devem ser cruzadas com uma estirpe que tenha marcadores genéticos que permitam fazer a distinção entre gâmetas derivados das CEEs modificadas e os gâmetas derivados do embrião recetor. Contudo, na impossibilidade de ter uma estirpe com um marcador genético diferente da estirpe dadora de embriões, o mais importante é usar uma estirpe de murganho que tenha um marcador genético diferente do da estirpe que deu origem às CEEs usadas na agregação.

Note-se que apenas metade dos gâmetas derivados das CEEs têm o alelo modificado por recombinação homóloga (regra geral a recombinação homóloga como vetor de mutação electroporado ocorre apenas num dos alelos, pelo que as CEEs são sempre heterozigóticas para a mutação).

Uma vez que os genes que determinam a cor da pelagem estão entre os primeiros a ser estudados, os *loci* foram designados alfabeticamente. Existem vários, mas os 4 mais importantes são: *A* (*agouti*), dominante, *b* (*castanho*), *c* (*albino*) e *d* (*dilute*) recessivos. Nos murganhos *agouti*, os pelos são pretos com uma banda subapical amarela dando uma pelagem de aspeto castanho escuro.

Assim, ao cruzar uma quimera com animais da linha CD-1 ou NMRI, ambas *albino* (*c/c*) pode-se concluir que houve contribuição das CEEs R1 (*A/A*) para as células da linha germinativa quando entre os descendentes surgem animais com pelagem de cor *agouti* (*A/c*). Quando todos os descendentes deste primeiro cruzamento são fenotipicamente *agouti*, então pode-se concluir que essa é uma quimera "forte" pois teve uma elevada contribuição das CEEs modificadas para as células da linha germinativa. Nas quimeras em que o embrião dador (CD-1 ou NMRI) também contribuiu para as células da linha germinativa, então entre os descendentes surgem animais *agouti* (*A/c*) e albinos (*c/c*).

No presente trabalho todas as quimeras nascidas (fortes ou fracas) foram cruzadas com animais das estirpes CD-1 ou NMRI e foi analisada a frequência de descendentes *agouti* e albino.

3.5.17. Confirmação da introdução da mutação nos descendentes *agouti* (F1)

Como já foi referido, apenas metade dos gametas derivados das CEEs têm o alelo modificado por recombinação homóloga. Assim, um descendente *agouti* resultante do cruzamento de uma quimera (Tsp18^{lox/wt} e Tsp18^{wt/wt}) com animais albinos da estirpe CD-1 (Tsp18^{wt/wt}) deverá ser testado para a presença da mutação introduzida nas CEEs.

Para isso, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (Tsp18Neo) com sequências iniciadoras que hibridam na cassette de seleção positiva (*Neo*). As sequências dos oligonucleótidos iniciadores (Tsp18FWNeoV5 e Tsp18REVNeoV5) e as condições da reação encontram-se em anexo IV.

Para controlo negativo foi utilizado como molde ADN genómico extraído da cauda de um animal *WT* e para controlo positivo foi utilizado como molde ADN genómico extraído de um clone de CEEs recombinantes. Fez-se também o controlo negativo da reação com água.

A presença do produto desta reação, com 360 pb, foi avaliada após eletroforese em gel de agarose a 1% (realizada tal como descrito em 3.6.2).

Além da genotipagem para avaliar a presença do gene *Neo*, para confirmar a recombinação homóloga no local correto, foi ainda realizada a reação de PCR (Tsp18RA) descrita em 3.5.6. (Figura 18), usando apenas os oligonucleótidos iniciadores Tsp18RAFWNeoV5 e Tsp18RAREVoHA (que nos permitem obter um fragmento com 5141 pb no caso de existir o alelo mutante resultante da recombinação homóloga com o vetor Tsp18cKO) e como molde ADN extraído das caudas dos descendentes F1 *agouti*.

3.5.18. Cruzamentos dos descendentes F1 *agouti* (Tsp18^{lox/wt})

Uma vez que são muito poucos os genes estudados com comprovada haploinsuficiência, de modo a obter uma linha de murganhos com ambos os alelos do gene *tspan18* flanqueados por sequências *loxP* (Tsp18^{floxed} ou Tsp18^{lox/lox}), foi necessário cruzar entre si os descendentes F1 *agouti*, positivos para o gene *Neo* e em que se confirmou a recombinação homóloga com o PCR Tsp18RA. Dos cruzamentos dos animais F1 selecionados (Tsp18^{lox/wt}) entre si, de acordo com as leis de Mendel, apenas resultarão cerca de 50% de animais Tsp18^{lox/wt}, 25% de animais Tsp18^{lox/lox} e 25% de animais Tsp18^{wt/wt}.

O principal objectivo do presente trabalho consiste na obtenção de uma linha de murganhos em que seja possível estudar a função da Tetraspanin18 especificamente no endotélio vascular tanto na vida adulta como durante o desenvolvimento embrionário. Assim, de modo a obter uma linha de murganhos com perda-de-função desta *Tspan*, de forma induzível, especificamente no endotélio vascular (Tsp18^{lox/lox}-*VE-cadherin-Cre-ER*^{T2}), os animais F1 selecionados (Tsp18^{lox/wt}) foram cruzados com murganhos da linha transgénica *VE-cadherin-Cre-ER*^{T2}

(Monvoisin et al., 2006) já existentes no laboratório. Deste cruzamento, de acordo com as leis de Mendel, resultarão cerca de 50% de animais *Tsp18^{lox/wt}* e 50% de animais *Tsp18^{wt/wt}*. Entre os 50% de animais *Tsp18^{lox/wt}* cerca de metade serão duplos mutantes, isto é, de todos os descendentes, apenas 12,5% serão *Tsp18^{lox/wt}* e expressarão a recombinase Cre nos locais onde o promotor da caderina endotelial vascular estiver ativo.

Como também seria interessante ter a possibilidade de estudar os efeitos da perda-de-função ubíqua de Tetraspanin18 (*Tsp18^{lox/lox}-CAGG-Cre-ERTM*), tanto durante a vida adulta como no desenvolvimento embrionário, os animais F1 selecionados *Tsp18^{lox/wt}* foram cruzados com murganhos da linha transgênica de *CAGG-Cre-ERTM* em fundo genético C57BL/6, já existentes no laboratório. Deste cruzamento, de acordo com as leis de Mendel, resultarão cerca de 50% de animais *Tsp18^{lox/wt}* e 50% de animais *Tsp18^{wt/wt}*. Entre os 50% de animais *Tsp18^{lox/wt}* cerca de metade serão duplos mutantes, isto é, de todos os descendentes, 12,5% serão *Tsp18^{lox/wt}* e expressarão a recombinase Cre associada à atividade do promotor CAGG em todos os tecidos.

3.5.18.1. Genotipagem dos descendentes F2

Para selecionar os descendentes F2 homo e heterozigóticos (*Tsp18^{lox/wt}* e *Tsp18^{lox/lox}*) resultantes dos cruzamentos dos descendentes F1 entre si, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (Tsp18F2) com três sequências iniciadoras em simultâneo. A sequência iniciadora direta (Tsp18FW2) em conjunto com uma das sequências iniciadoras reversa (Tsp18REVWT2) permite a amplificação de um produto com 374 pb em todos os animais, servindo assim de controlo da reação. A mesma sequência iniciadora direta (Tsp18FW2) em conjunto com a outra sequência iniciadora reversa (Tsp18REVNeo2) permite a amplificação de um produto com 567 pb apenas nos animais *Tsp18^{lox/wt}* e *Tsp18^{lox/lox}*. As sequências dos oligonucleótidos iniciadores (Tsp18FW2, Tsp18REVWT2, Tsp18REVNeo2) e as condições da reação (Tsp18F2) encontram-se no anexo IV.

Realizando a reação em cadeia da polimerase atrás descrita (Tsp18F2), fez-se também uma primeira seleção dos animais F2 resultantes dos cruzamentos dos F1 (*Tsp18^{lox/wt}*) com a linha de murganhos *VE-cadherin-Cre-ER^{T2}*. Entre estes (*Tsp18^{lox/wt}*), como cerca de metade serão duplos mutantes, isto é, expressarão de forma induzível a recombinase Cre associada ao promotor da VE-caderina, foi ainda necessário testar a presença do gene *Cre*. Para tal, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (VECad-Cre) com duas sequências iniciadoras que permitem a amplificação de um produto com 350 pb, correspondente a uma parte do gene *Cre*, apenas para as amostras de ADN genómico dos animais *Tsp18^{lox/wt}*. As sequências dos oligonucleótidos iniciadores (Cre 313U e Cre 6831) e as condições da reação (VECad-Cre) encontram-se no anexo IV. Para controlo negativo foi utilizado como molde ADN genómico

extraído da cauda de um animal *WT* e para controlo positivo foi utilizado como molde ADN genómico extraído da cauda de um animal *VE-Cadherin-Cre-ER^{T2}*. Fez-se também o controlo negativo da reação com água.

Realizando a reação em cadeia da polimerase atrás descrita (Tsp18F2), fez-se uma primeira seleção dos animais F2 resultantes dos cruzamentos dos F1 (*Tsp18^{lox/wt}*) com a linha de murganhos *CAGG-Cre-ERTM*. Entre estes (*Tsp18^{lox/wt}*), como cerca de metade serão duplos mutantes, isto é, expressarão de forma induzível a recombinase Cre associada ao promotor ubíquo CAG, foi necessário testar a presença do gene *Cre*. Para tal, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (CAG-Cre) com duas sequências iniciadoras que permitem a amplificação de um produto com 100 pb, correspondente a uma parte do gene *Cre*, apenas para as amostras de ADN genómico dos animais *Tsp18^{lox/wt}*. As sequências dos oligonucleótidos iniciadores (CAGCre1 e CAGCre2) e as condições da reação (CAG-Cre) encontram-se no anexo IV. Para controlo negativo foi utilizado como molde ADN genómico extraído da cauda de um animal *WT* e para controlo positivo foi utilizado como molde ADN genómico extraído da cauda de um animal *CAGG-Cre-ERTM*. Fez-se também o controlo negativo da reação com água.

3.5.19. Cruzamentos dos descendentes F2 entre si

Os animais F2 *Tsp18^{lox/wt}* foram cruzados entre si de modo a obter cerca de 50% de descendentes F3 *Tsp18^{lox/wt}* e 25% de descendentes F3 *Tsp18^{lox/lox}*.

Os animais F2 *Tsp18^{lox/wt}-VE-Cad-Cre-ER^{T2+/-}* foram cruzados entre si de modo a obter cerca de 12,5% de descendentes F3 *Tsp18^{lox/lox}-VE-Cad-Cre-ER^{T2+/-}*.

Os animais F2 *Tsp18^{lox/wt}-CAGG-Cre-ER^{TM+/-}* foram também cruzados entre si de modo a obter cerca de 12,5% de descendentes F3 *Tsp18^{lox/lox}-CAG-Cre-ER^{TM+/-}*.

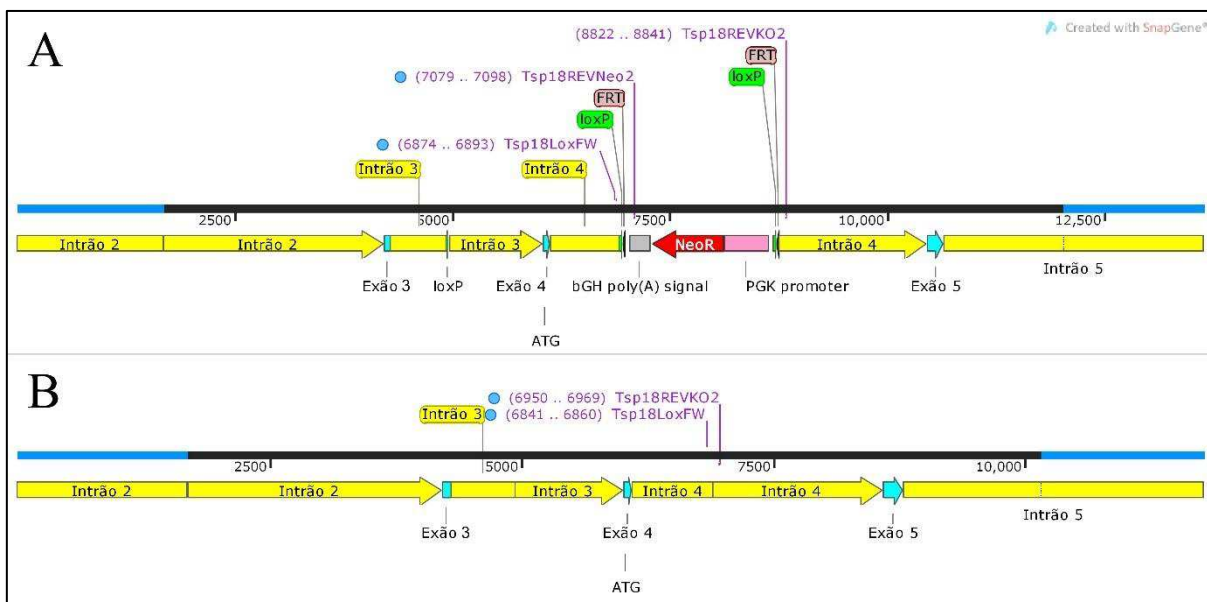
3.5.19.1. Genotipagem dos descendentes F3

Nos descendentes F3, a primeira genotipificação incidiu sobre o gene *tsp18 floxed*.

Para detetar animais homozigóticos *Tsp18^{lox/lox}* foi necessário desenhar um novo PCR, uma vez que o usado anteriormente nos descendentes F2 (Tsp18F2) apenas identificava animais mutantes sem discriminar entre animais homo ou heterozigóticos.

Foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (Tsp18HOMO) com três sequências iniciadoras. A sequência iniciadora direta (Tsp18loxFW), que hibrida imediatamente a montante da cassette de seleção positiva, em conjunto com a sequência iniciadora reversa que hibrida na cassette de seleção positiva, Tsp18RevNeo2, permite a amplificação de um produto com 240 pb (alelo mutante) nos animais *Tsp18^{lox/lox}* e *Tsp18^{lox/wt}* (Figura 24A).

Figura 24 - Representação esquemática dos locais de hibridação das sequências iniciadoras usadas no PCR Tsp18HOMO. (A) Alelo mutante. (B) Alelo *WT*.



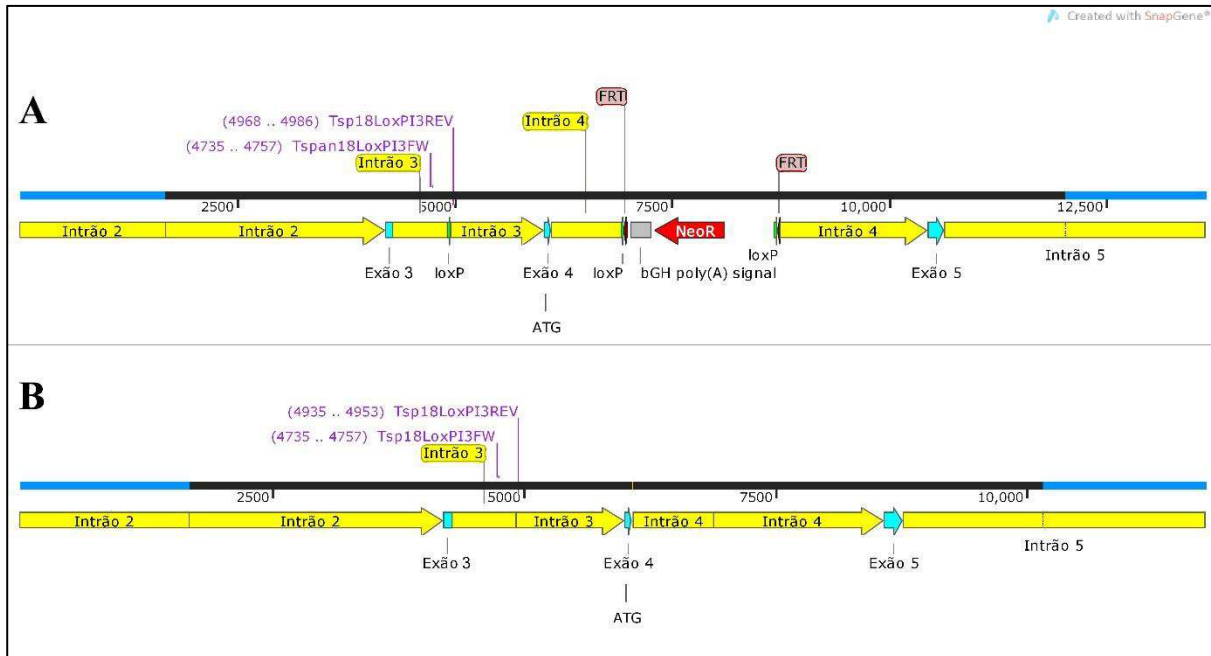
Dadas condições limitantes à reação em cadeia da polimerase, a mesma sequência iniciadora direta (Tsp18loxFW) em conjunto com a sequência iniciadora reversa que hibrida imediatamente a jusante da cassette de seleção positiva, Tsp18RevKO2, permite a amplificação de um produto com 130 pb (alelo *WT*) apenas nos animais Tsp18^{lox/wt} e Tsp18^{wt/wt} (Figura 24B). Assim, o ADN de animais Tsp18^{lox/wt} (heterozigóticos) permite obter dois amplicões, um com 130 pb e um com 240 pb. O ADN de animais Tsp18^{lox/lox} (homozigóticos) apenas permite obter o amplicão com 240 pb e o ADN de animais Tsp18^{wt/wt} (*WT*) apenas permite obter o amplicão com 130 pb. As sequências dos oligonucleótidos iniciadores (Tsp18loxFW, Tsp18RevNeo2, Tsp18RevKO2) e as condições da reação (Tsp18HOMO) encontram-se no anexo IV. Para controlo negativo foi utilizado como molde ADN genómico extraído da cauda de um animal *WT* e para controlo positivo foi utilizado como molde ADN genómico extraído de um animal F2 Tsp18^{lox/wt}.

Foi realizada ainda uma outra reação em cadeia da polimerase (Tsp18loxI3), mais simples, com apenas duas sequências iniciadoras, para seleção dos descendentes F3 homozigóticos. A sequência iniciadora direta (Tsp18loxI3FW2) que hibrida imediatamente a montante do primeiro local *loxP* (no intrão 3) em conjunto com a sequência iniciadora reversa (Tsp18loxI3REV2) que hibrida imediatamente a jusante do mesmo local, permitem a amplificação de um produto com 253 pb (Figura 25A) nos animais Tsp18^{lox/lox} e Tsp18^{lox/wt} e de 210 pb (Figura 25B) nos animais Tsp18^{lox/wt} e Tsp18^{wt/wt}.

O ADN de animais Tsp18^{lox/lox} (homozigóticos) apenas permite obter um fragmento com 253 pb, o ADN de animais Tsp18^{wt/wt} (*WT*) apenas permite obter um fragmento com 210 pb e o ADN de animais Tsp18^{lox/wt} (heterozigóticos) permite obter dois fragmentos, um com 253 pb e

um com 210 pb. As sequências dos oligonucleótidos iniciadores (Tsp18loxI3FW2, Tsp18loxI3REV2) e as condições da reação (Tsp18LoxI3) encontram-se no anexo IV. Para controlo negativo foi utilizado como molde ADN genómico extraído da cauda de um animal *WT* e para controlo positivo foi utilizado como molde ADN genómico extraído de um animal F2 Tsp18^{lox/wt}.

Figura 25 - Representação esquemática do local de hibridação das sequências iniciadoras usadas no PCR Tsp18LoxI3. (A) Alelo mutante. (B) Alelo *WT*.



No caso das duas linhas condicionais induzíveis, realizou-se uma segunda genotipificação apenas dos animais que revelaram ser homozigóticos (Tsp18^{lox/lox}) na primeira. Esta segunda genotipificação foi realizada tal como descrito acima em 3.5.18.1. (reações em cadeia da polimerase VECad-Cre e CAG-Cre).

3.5.20. Sequenciação do braço esquerdo de homologia

Foi realizada a sequenciação completa do braço esquerdo de homologia do vetor de mutação utilizado (Tspan18cKO) em amostras de ADN genómico de dois dos clones de CEEs que deram origem a quimeras e de um animal F3 homozigótico pelo PCR Tsp18HOMO.

Para tal, foi realizado um PCR (Tsp18LA) em que se prepararam 6 reações para cada uma das amostras referidas. A sequência iniciadora direta (LAFW2) em conjunto com a sequência iniciadora inversa (LAREV2Neo) permitem a amplificação de um fragmento com 5583 pb.

3.5.20.1. Sequenciação direta do produto de PCR

Os produtos de cada 6 reações foram carregados em apenas um poço de um gel de agarose a 0,8% (p/v) e fez-se a eletroforese (veja-se 3.6.2.). De seguida, foi realizada a extração do fragmento de 5583 pb obtido com cada uma das amostras de ADN molde, a partir do gel de agarose, de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial (Qiagen®, QIAquick Gel Extraction Kit, 28706). No final, cada fragmento foi eluído em 30 µL de água desionizada livre de nucleases. As amostras assim obtidas foram enviadas para sequenciação pelos serviços da STABVIDA. As sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados nas reações de sequenciação (Tsp18LAFW2, Tsp18LAFW3, Tsp18LAFW4, Tsp18LAFW5, Tsp18LAFW6, Tsp18LAREV2neo) encontram-se no anexo V. Todas as regiões do fragmento de 5583 pb sequenciadas foram analisadas no programa BLAST® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschup et al., 1990) para nucleótidos com o algoritmo “blastn” em que se pediu para alinhar duas ou mais sequências, neste caso alinharam-se as sequências devolvidas pelo serviço de sequenciação com a sequência prevista para a mesma região do braço de homologia.

3.5.20.2. Clonagem e sequenciação do produto de PCR da região a jusante do 1º *loxP*

Não tendo sido possível a sequenciação completa diretamente a partir do fragmento 5583 pb atrás descrito, extraído do gel de agarose, foi realizado um PCR (Tsp18LA3) para amplificar a região a jusante (cerca de 2667 pb) do primeiro local *loxP*. Como ADN molde foram usadas amostras de ADN genómico de dois dos clones de CEEs que deram origem a quimeras e de um animal F3 homozigótico pelo PCR Tsp18HOMO. Para cada amostra foram realizadas 4 reações. As sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados (Tsp18loxI3FW2 e Tsp18REVNeoV5) e as condições da reação encontram-se no anexo IV. Para controlo negativo foi utilizado como molde ADN genómico extraído da cauda de um animal *WT* e para controlo positivo ADN do vetor Tsp18cKO.

Parte do produto de uma das reações de cada amostra de ADN, foi carregado num gel de agarose para avaliar a presença do fragmento esperado. O restante produto das reações de PCR foi limpo de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial usado (Qiagen, QIAquick PCR Purification Kit, 28104) antes de ser ligado ao vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega, A1380), também de acordo com as instruções do fabricante. Foi usado um *ratio* de 5/1 (*insert*/vetor). Cada reação foi realizada num volume final de 10 µL e usou 50 ng de vetor. A ligação (por ação da T4 ADN ligase) decorreu por incubação a 4 °C durante a noite. No dia seguinte o produto de cada ligação foi usado para transformar bactérias competentes *Escherichia coli* estirpe DH5α (gentilmente cedidas pelo laboratório de Nutrição Animal e Biotecnologia do CIISA) de acordo com o método já descrito (veja-se 3.5.1.1). Como a inserção

de um produto de PCR no vetor pGEM®-T easy, conduz à inativação do gene *lacZ* (impedindo assim a síntese da β -galactosidase), a utilização de placas de LB-agar ampicilina com IPTG (*Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside*; Bioline, BIO-37036) e X-Gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside*; Bioline, BIO-37035), permite a identificação dos recombinantes por seleção branco-azul. Estas placas foram preparadas espalhando 100 μ L de IPTG a 100 mM e 50 μ L de X-Gal a 20 mg/mL sobre a superfície de cada placa de LB-agar ampicilina e aguardando cerca de 30 minutos à temperatura ambiente para o agar absorver completamente o IPTG e o X-Gal. No dia seguinte à transformação, 20 colónias brancas (as colónias brancas são as recombinantes, pois como não têm β -galactosidase, não têm capacidade para hidrolisar o substrato cromogénico X-Gal e produzir um precipitado azul intenso sobre a colónia) de cada ligação foram picadas e usadas para fazer um riscado numa nova placa de LB agar com ampicilina, IPTG e X-Gal. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite e no dia seguinte foi feita uma extração rápida (*cracking*) do ADN plasmídico picando uma parte do riscado para o fundo de um *eppendorf*. Cada colónia foi ressuspensa adicionando 25 μ L de uma solução de EDTA 10 mM, pH 8,0 e agitando vigorosamente no *vortex*. De seguida foi adicionado 25 μ L de tampão de lise de bactérias (anexo I - *cracking buffer*) a cada colónia e fez-se a homogeneização agitando novamente no *vortex*. Após uma incubação de 5 minutos a 70°C na placa de aquecimento, os tubos foram arrefecidos até alcançarem a temperatura ambiente antes de adicionar a cada colónia 4 μ L de uma solução com 25% de KCl 4M (anexo I) e 75% de tampão de amostra. A homogeneização foi feita por agitação vigorosa num *vortex*. De seguida os tubos foram colocados sobre gelo durante 5 minutos antes de serem centrifugados a 13000 rpm durante 5 minutos. No final, aplicou-se 30 μ L do sobrenadante de cada tubo num poço de um gel de agarose a 1%. Um dos poços foi carregado com ADN plasmídico extraído de células competentes transformadas apenas com o vetor (pGEM T easy). Após a eletroforese (realizada tal como descrito em 3.6.2) foi avaliado se o ADN plasmídico tinha ou integrado o produto de PCR por diferença de tamanho molecular. As colónias que se concluiu terem integrado o produto de PCR foram repicadas para 3 mL de meio LB com ampicilina e crescidas por incubação a 37°C com agitação (200 rpm) na incubadora orbital Gallempkamp durante a noite. No dia seguinte o ADN plasmídico foi extraído em pequena escala (tal como descrito em 3.5.1.2.) para de seguida serem feitas digestões de diagnóstico com endonucleases de restrição (veja-se 3.5.1.4). Foi usada *EcoRI* que remove o produto de PCR, *Sall* e *ClaI* que linearizam por terem um local de reconhecimento no produto e no vetor, respetivamente, e *NotI*, que tal como *EcoRI* remove o produto de PCR por ter dois locais de reconhecimento, um a montante e outro a jusante do local de inserção, no vetor (as sequências dos locais de reconhecimento de cada endonuclease de restrição encontram-se no anexo VI). As colónias com o padrão de

restrição previsto foram enviadas para sequenciação pelos serviços da STABVIDA. A sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados, M13FW, 2.7FW2, 2.7FW3, 2.7FW4, M13REV encontram-se no anexo V. Todas as regiões do fragmento de 2667 pb sequenciadas foram analisadas no programa BLAST[®] (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschup et al., 1990) para nucleótidos com o algoritmo “blastn” em que se pediu para alinhar duas ou mais sequências, neste caso alinharam-se as sequências devolvidas pelo serviço de sequenciação com a sequência prevista para a mesma região do braço de homologia.

3.6. Procedimentos e reagentes comuns aos trabalhos experimentais II e III

3.6.1. Extração de ADN da cauda

De modo a obter ADN para genotipar os murganhos, por volta das 4-5 semanas de idade, quando os descendentes resultantes dos cruzamentos com linhas transgênicas foram desmamados, separados por género e marcados individualmente, foi também recolhido um pequeno fragmento (com cerca de 3 mm) da região terminal da cauda.

Para obter ADN a partir de um fragmento da cauda, realizou-se um protocolo de extração “suja” (anexo I), que consiste essencialmente na digestão enzimática na presença de detergentes (tampão de digestão de caudas – anexo I), do tecido da cauda, seguida da precipitação de proteínas e detritos celulares por uma solução salina concentrada, mantendo o ADN em solução. O ADN é depois precipitado por ação do isopropanol e lavado com etanol a 70% antes de ser ressuspenso em tampão TE (anexo I). As amostras de ADN foram armazenadas a -20°C.

3.6.2. Eletroforese em géis de agarose

No presente trabalho foram preparados apenas mini-géis de agarose (SeaKem[®] LE Agarose, Lonza, 50005) com concentrações de 0,8, 1 ou 2% (p/v) em tampão de eletroforese TAE 1× (tris-acetato-EDTA, anexo I), com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich[®], E1510), para avaliar os produtos das reações de digestão do vetor Tsp18cKO com endonucleases de restrição e para detetar os produtos das diversas reações de PCR realizadas para genotipar os murganhos. A migração das amostras de ADN ocorreu a cerca de 86 mA.

3.7. Análise estatística

O processamento de dados foi realizado com recurso ao *software* SPSS v17.0 (*Statistical Package for the Social Sciences version 17.0*, Chicago, IL).

Quando os dados obtidos cumpriam os requisitos de igualdade de variâncias entre grupos e de normalidade da distribuição das observações, para determinar se existiam ou não diferenças significativas entre os grupos experimentais, foi aplicado o teste paramétrico de t-student.

Quando os dados não cumpriam estes pressupostos e/ou as amostras eram demasiado pequenas, foi usado o teste não paramétrico Mann-Whitney U.

Os resultados do trabalho experimental I, são apresentados como a média \pm erro padrão da média (SEM). Nos trabalhos experimentais II e III, os resultados de cada grupo experimental são apresentados como média (desvio padrão).

Os valores de significância $p < 0,05$, $< 0,01$ e $< 0,001$ foram considerados significativos (indicados na figura com *), muito significativos (indicados nas figuras com **) e altamente significativos (indicados nas figuras com ***), respetivamente.

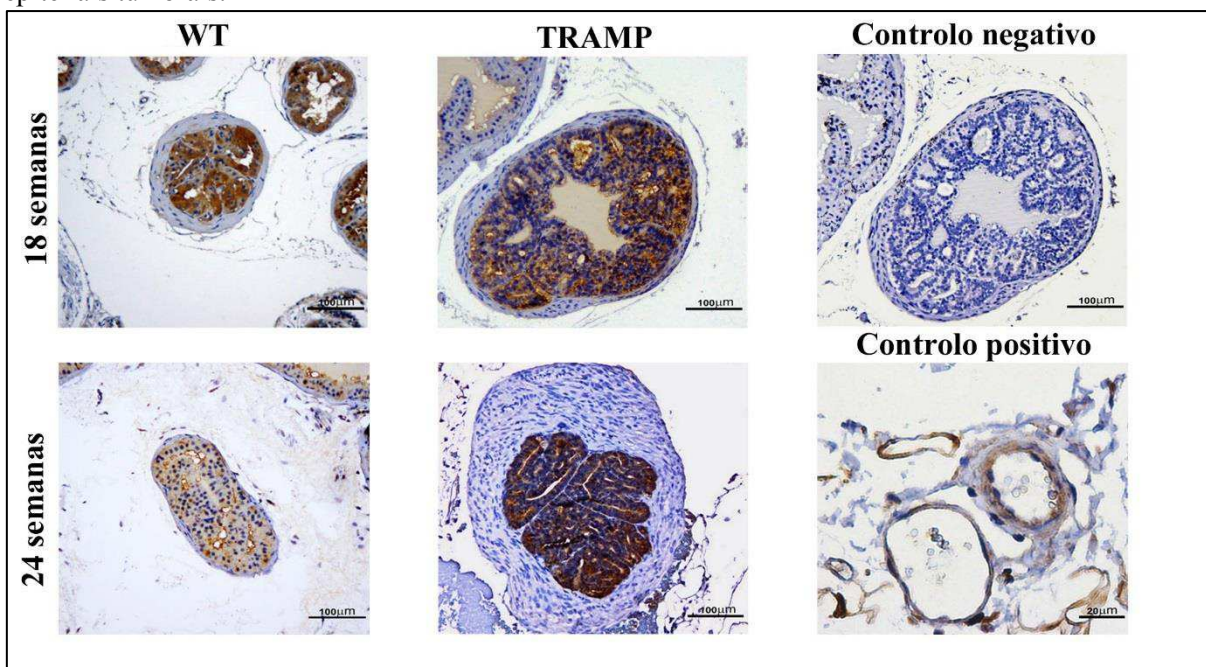
4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da eficácia da combinação Dll4Fc-doxorrubicina no tratamento do adenocarcinoma prostático

4.1.1. Dll4 é expresso na vasculatura e células epiteliais da próstata e sobre-expresso nas células epiteliais dos tumores prostáticos de murganhos TRAMP

A expressão dos membros da via de sinalização Notch apresenta-se desregulada em muitos tumores sólidos, incluindo o cancro prostático. Notch participa no controlo da morfogénese prostática e é cada vez mais um reconhecido marcador de malignidade. Apesar de existir já algum conhecimento sobre os padrões de expressão da maioria dos componentes desta via de sinalização na próstata normal e tumoral, alguns membros estão ainda pouco estudados, como é o caso do ligando Dll4.

Figura 26 - Dll4 encontra-se nas células endoteliais e epiteliais da próstata normal mas é sobre-expresso na próstata tumoral de murganhos TRAMP. Imagens representativas de seções histológicas da próstata de murganhos C57BL/6 (*WT*) e de murganhos TRAMP com 18 e 24 semanas de idade, em que foi realizada imunohistoquímica para revelação da localização do ligando Dll4. Nos murganhos *WT*, tanto às 18 como às 24 semanas de idade, verifica-se que Dll4 tem expressão epitelial prostática discernível, encontrando-se ainda nas células endoteliais (controlo positivo). Nos murganhos TRAMP, tanto às 18 como às 24 semanas de idade, Dll4 encontra-se sobre-expresso nas células epiteliais tumorais.



No presente trabalho, realizámos a marcação do ligando Dll4 por imunohistoquímica, em próstatas de murganhos C57BL/6 e de murganhos TRAMP, como exemplo de uma próstata afetada por um tumor.

Enquanto nas próstatas dos murganhos controlo (C57BL/6), Dll4 foi detetado nas células endoteliais e epiteliais (Figura 26), nas próstatas dos murganhos TRAMP, Dll4 apresentava maior intensidade de marcação nas células epiteliais tumorais (Figura 26), tanto às 18 como às

24 semanas de idade, o que valida o ligando Dll4 como um potencial alvo terapêutico no cancro da próstata.

4.1.2. A terapia com sDll4Fc administrada numa fase precoce do desenvolvimento inibe o crescimento tumoral prostático

Para estabelecer uma base de referência para a eficácia da monoterapia com sDll4Fc no modelo TRAMP, foram realizados ensaios em dois contextos diferentes. No primeiro ensaio, que decorreu num contexto semelhante ao de deteção precoce da doença, a terapia foi iniciada quando os murganhos TRAMP atingiam as 12 semanas de idade e já apresentam PIN ou pequenos adenocarcinomas bem diferenciados. Este regime terapêutico foi interrompido 6 semanas depois do seu início para avaliar o efeito do sDll4Fc no crescimento tumoral e na vasculatura associada. Este ensaio foi repetido e cada grupo experimental incluiu 5 animais, totalizando assim 10 animais TRAMP por grupo.

Para estimar o crescimento tumoral, o peso total da próstata dos murganhos TRAMP foi medido e comparado com o peso total da próstata de murganhos com o mesmo fundo genético (C57BL/6) e a mesma idade, mas sem tumores.

Às 18 semanas de idade, os murganhos TRAMP (não tratados) apresentaram um aumento de 134% no peso prostático (234 mg), relativamente aos murganhos C57BL/6 *WT* (97,8 mg). No caso dos murganhos TRAMP tratados com sDll4Fc esse mesmo aumento foi de apenas 27% (124,5 mg) (Figura 27A), o que corresponde a uma taxa de inibição do crescimento tumoral de cerca 80%.

Os tumores prostáticos dos murganhos TRAMP não tratados cresceram 5 vezes mais do que os de murganhos TRAMP tratados com sDll4Fc, durante o mesmo período de 6 semanas. A análise histopatológica revelou que, apesar das diferenças de crescimento, o estágio de desenvolvimento de tumores tratados e não tratados foi o mesmo às 18 semanas (dados não apresentados). Nos tumores tratados com sDll4Fc, e de acordo com a redução do crescimento tumoral, a frequência de células apoptóticas aumentou 74% (Figura 27G), enquanto a frequência de células em proliferação diminuiu 44% (Figura 27H), relativamente a tumores não tratados.

A avaliação da estrutura da vasculatura tumoral revelou que a densidade vascular tumoral nos murganhos TRAMP tratados com sDll4Fc aumentou 85% relativamente à dos murganhos TRAMP não tratados (Figura 27C), enquanto o recrutamento de células murais perivasculares diminuiu 23% (Figura 27B,D). A par destas alterações, verificámos que também a função vascular tumoral foi profundamente afetada, com uma redução de 46% da perfusão vascular

(Figura 27B,E) e um aumento de 70% na extravasação (Figura 27B,F), relativamente aos controlos (murganhos TRAMP) não tratados.

Figura 27 - A monoterapia com sDII4Fc entre as semanas 12 e 18 é eficaz na redução do crescimento tumoral prostático de murganhos TRAMP por afetar a neoangiogénese tumoral. (A) O aumento no peso prostático decorrente do crescimento tumoral apresenta-se reduzido quando é administrado sDII4Fc aos murganhos TRAMP. (B) Imagens de imunofluorescência representativas da densidade vascular (anticorpo anti-PECAM, verde) e da maturidade vascular (anticorpo anti- α -SMA, vermelho), da perfusão vascular (Lectina, verde) e da densidade vascular (anticorpo anti-PECAM, vermelho), e da extravasação (Evans Blue, vermelho) e densidade vascular (anticorpo anti-PECAM, verde) da neo-vasculatura tumoral das próstatas recolhidas de animais TRAMP não tratados (TRAMP) ou tratados com sDII4Fc (TRAMP + DII4Fc). Os núcleos estão contrastados com DAPI (azul).

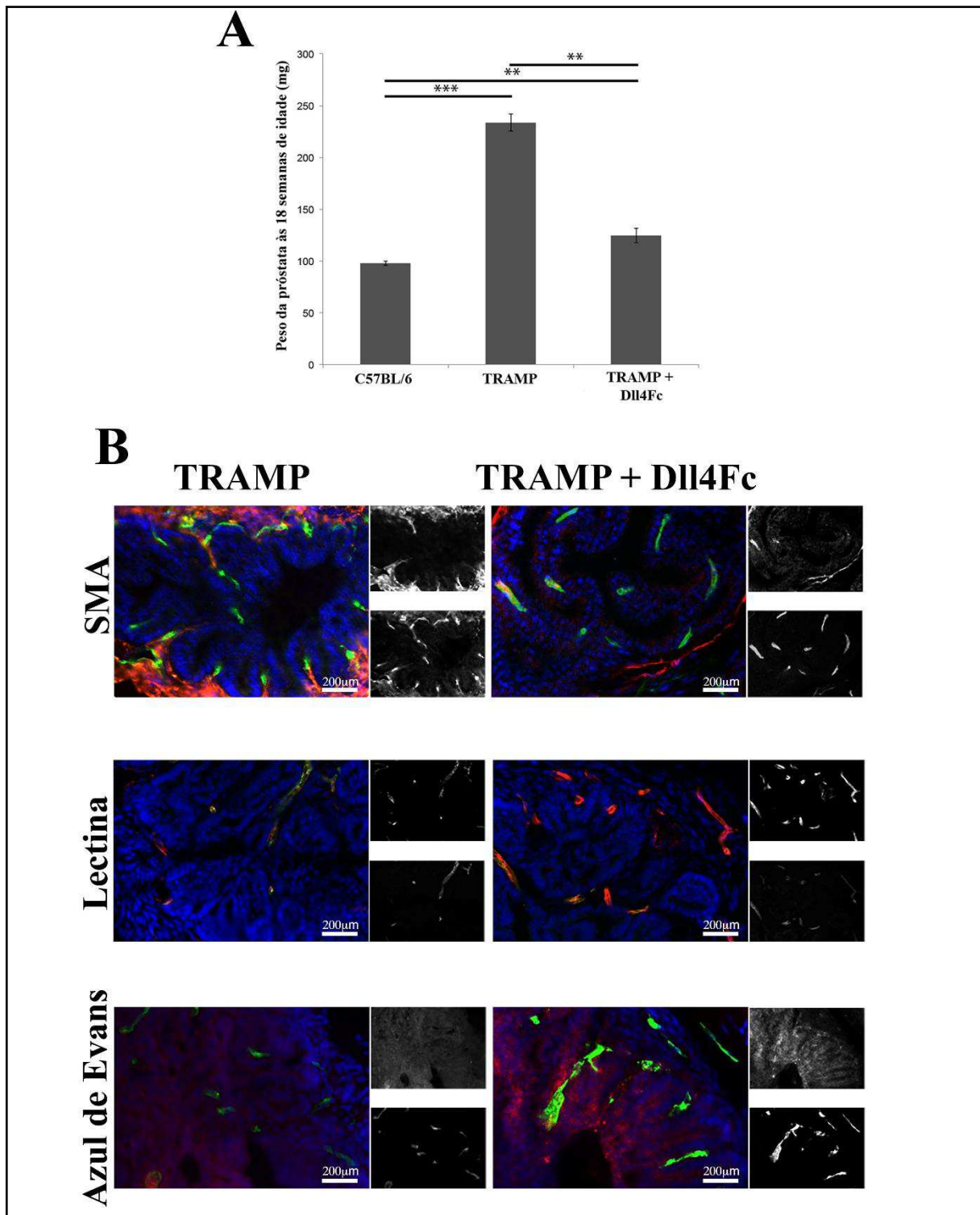
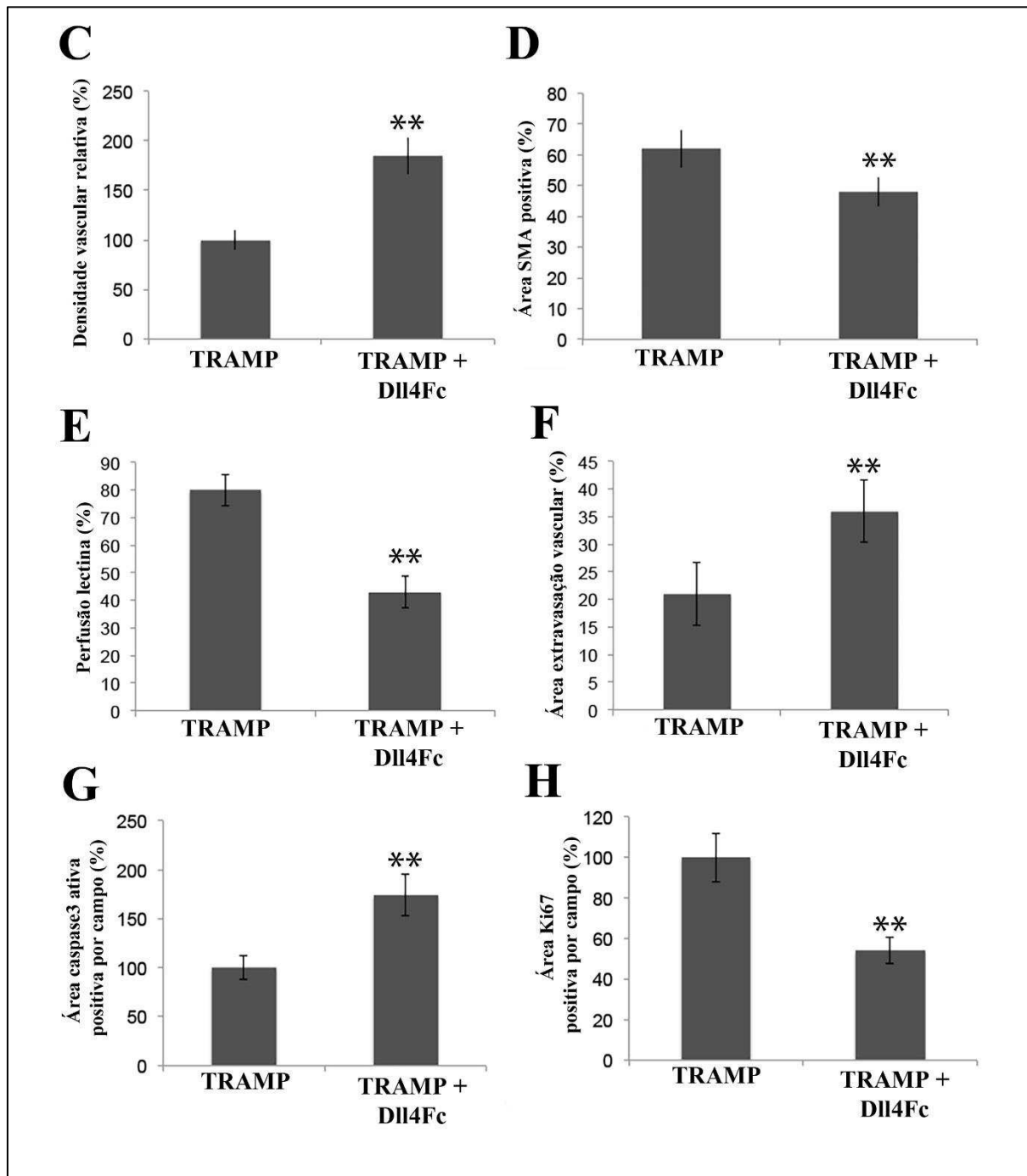


Figura 27 (continuação) - A monoterapia com sDII4Fc entre as semanas 12 e 18 é eficaz na redução do crescimento tumoral prostático de murganhos TRAMP por afetar a neoangiogênese tumoral. A densidade vascular (C) apresenta-se aumentada e o revestimento por células de músculo liso (D) reduzido nos tumores prostáticos de murganhos TRAMP tratados com sDII4Fc relativamente aos controlos (murganhos TRAMP não tratados). A terapia com sDII4Fc reduz a perfusão vascular (E) e aumenta os níveis de extravasação (F). A frequência de células apoptóticas (G) encontra-se aumentada ao contrário da frequência de células em proliferação (H) que se encontra reduzida nos tumores prostáticos dos murganhos TRAMP tratados com sDII4Fc. As colunas representam a média de 10 animais e as barras de erro representam o SEM. **, *** representam, respetivamente $p < 0,01$ e $p < 0,001$.



4.1.3. sDll4Fc é mais eficaz na redução do crescimento tumoral prostático quando administrado numa fase tardia do desenvolvimento tumoral

O segundo ensaio correspondeu a um contexto semelhante ao de deteção tardia da doença, tendo a terapia sido iniciada quando os murganhos TRAMP atingiam as 18 semanas de idade, uma altura em que já apresentam adenocarcinomas moderadamente a pouco diferenciados de tamanho considerável. Este regime terapêutico foi aplicado durante 6 semanas para avaliar o efeito do sDll4Fc no peso da próstata e no estado angiogénico tumoral. Este ensaio foi repetido e cada grupo experimental incluiu 5 animais, totalizando assim 10 animais TRAMP por grupo. O peso total da próstata foi medido e comparado com o peso total da próstata de murganhos com o mesmo fundo genético (C57BL/6) mas sem tumores, para estimar o peso tumoral total dos murganhos TRAMP.

Às 24 semanas de idade os murganhos TRAMP (não tratados) apresentaram um aumento de 149% no peso prostático (438 mg), relativamente a murganhos controlo C57BL/6 (176,8 mg). No caso dos murganhos TRAMP tratados com sDll4Fc esse mesmo aumento foi de apenas 16% (196,1 mg) (Figura 28A). Assim, a monoterapia com sDll4Fc administrada durante 6 semanas resultou numa inibição de 90% do crescimento tumoral prostático. A análise histopatológica não revelou diferenças no estágio de desenvolvimento dos tumores entre os dois grupos, os quais apresentavam adenocarcinomas bem diferenciados (dados não apresentados). A apoptose (Figura 28G) e a frequência de proliferação (Figura 28H), apresentaram um aumento de 89% e uma diminuição de 31%, respetivamente, nos tumores TRAMP tratados com a monoterapia sDll4Fc relativamente aos tumores TRAMP não tratados (controlo).

Os tumores de murganhos tratados com sDll4Fc apresentaram um aumento superior a 100% da densidade vascular (Figura 28B,C), enquanto o recrutamento de células perivasculares foi reduzido em 50%, relativamente aos tumores de murganhos TRAMP não tratados (controlo) (Figura 28D). Mais uma vez, verificou-se que a função vascular foi fortemente perturbada, com uma redução de 47% da perfusão vascular tumoral (Figura 28B,E) e um aumento de 113% da extravasação vascular tumoral (Figura 28B,F) relativamente à vasculatura dos tumores de murganhos TRAMP não tratados. Este efeito foi, contudo, mais acentuado do que o observado na monoterapia precoce (entre as semanas 12 e 18).

Figura 28 - A monoterapia com sDII4Fc entre as semanas 18 e 24 é mais eficaz na redução do crescimento tumoral prostático de murganhos TRAMP do que a monoterapia de intervenção precoce (entre as semanas 12 e 18). O aumento do peso prostático (A) decorrente do crescimento tumoral é fortemente inibido quando os murganhos TRAMP são tratados com sDII4Fc neste período (C57BL/6 – murganhos sem tumores; TRAMP – murganhos com tumores não tratados; TRAMP + DII4Fc – murganhos com tumores tratados com sDII4Fc). (B) Imagens de imunofluorescência representativas da densidade vascular (anticorpo anti-PECAM, verde) e da maturidade vascular (anticorpo anti- α -SMA, vermelho), da densidade vascular (anticorpo anti-PECAM, verde) e da perfusão (Lectina, verde) e da densidade vascular (anticorpo anti-PECAM, verde) e extravasação (Azul de Evans, vermelho) da neo-vasculatura tumoral das próstatas recolhidas de animais TRAMP com 24 semanas de idade não tratados (TRAMP) ou tratados com sDII4Fc (TRAMP + DII4Fc). Os núcleos estão contrastados com DAPI (azul).

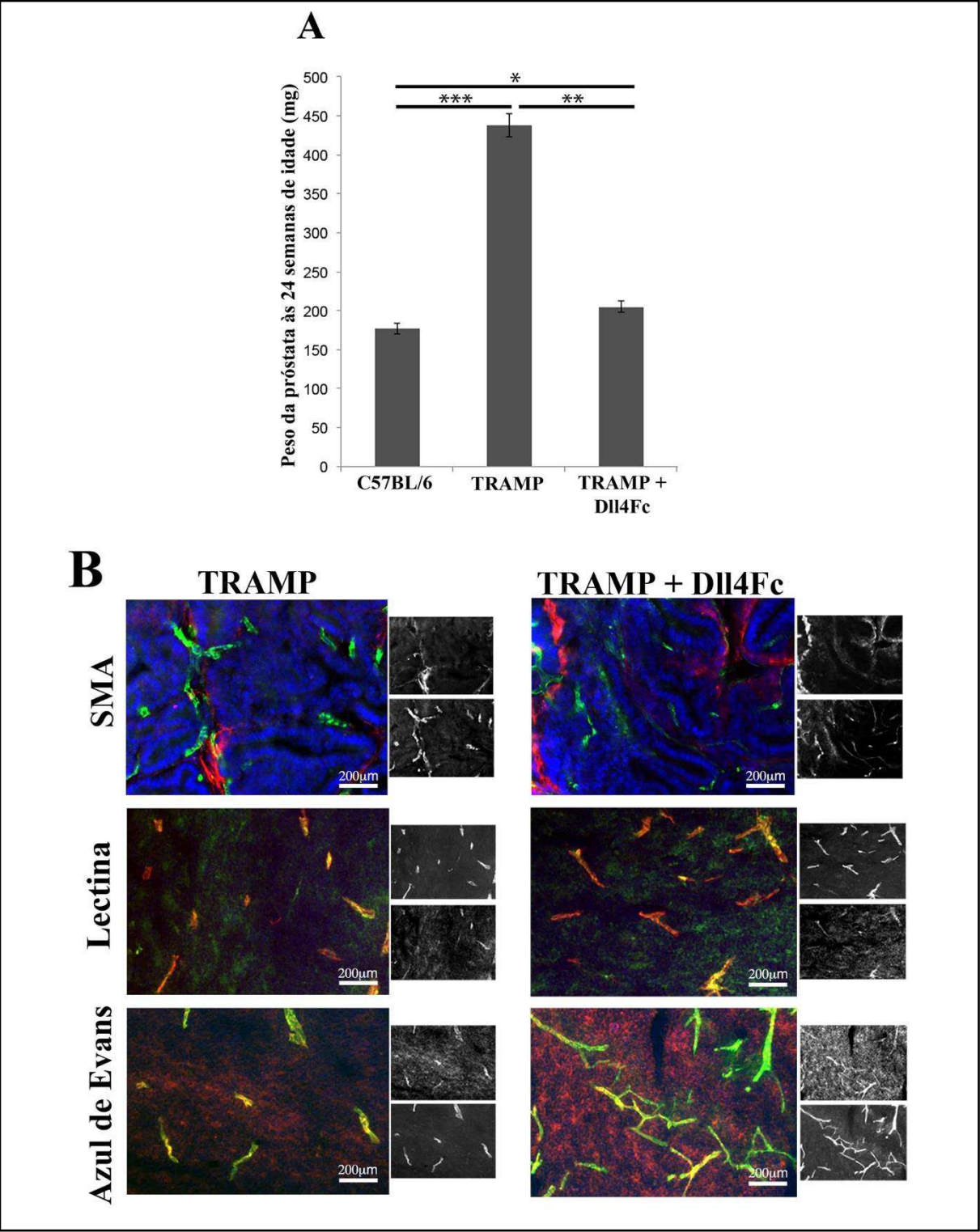
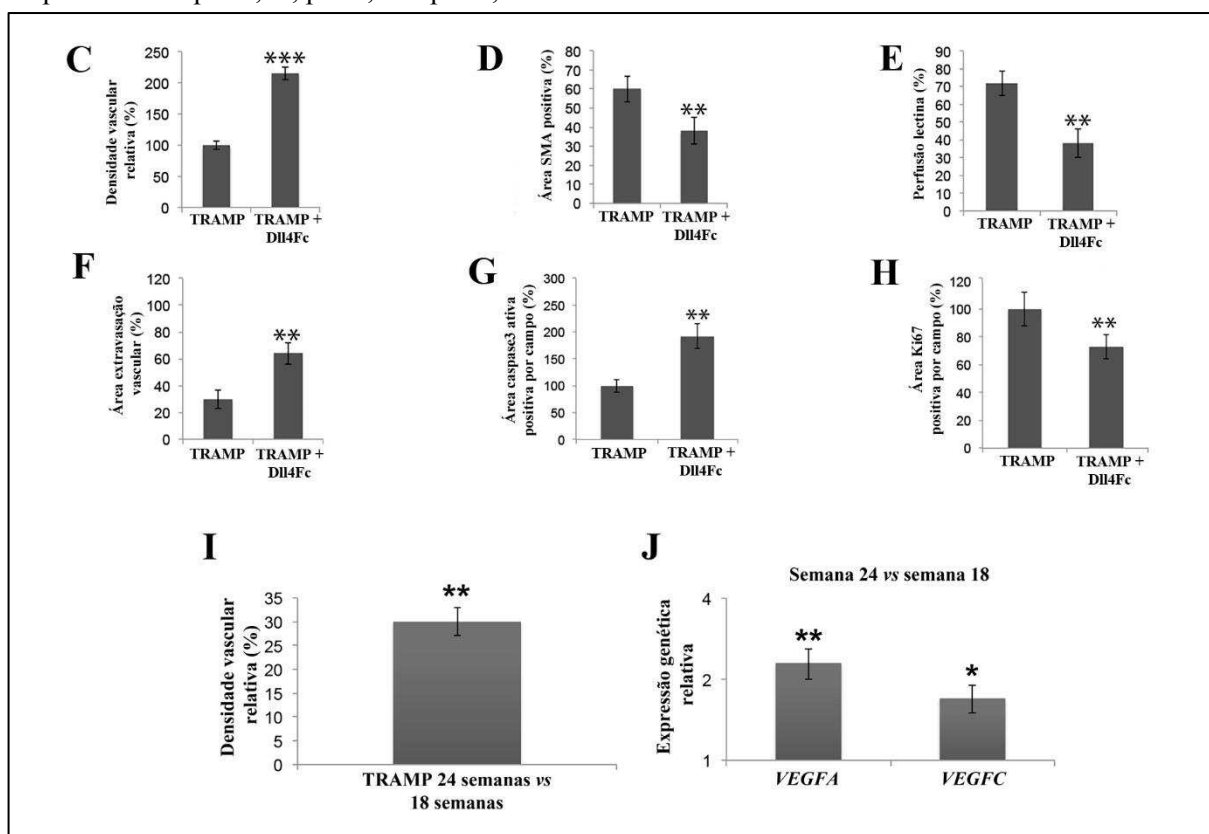


Figura 28 (continuação) - A monoterapia com sDII4Fc entre as semanas 18 e 24 é mais eficaz na redução do crescimento tumoral prostático de murganhos TRAMP do que a monoterapia de intervenção precoce (entre as semanas 12 e 18) A densidade vascular (C) está aumentada e o revestimento por células de músculo liso (D) está reduzido nos tumores prostáticos de murganhos TRAMP tratados com sDII4Fc. A terapia com sDII4Fc reduz a perfusão vascular (E) e aumenta os níveis de extravasação (F). A frequência de células apoptóticas (G) encontra-se aumentada ao contrário da frequência de células em proliferação (H) que se encontra reduzida nos tumores prostáticos dos murganhos TRAMP tratados com sDII4Fc. Os níveis da densidade vascular tumoral (I) prostática estão aumentados às 24 semanas de idade quando comparados com os das 18 semanas. Os níveis de transcrição de ARN para VEGFA e VEGFC (J) apresentam-se aumentados às 24 semanas de idade quando comparados com amostras prostáticas equivalentes recolhidas às 18 semanas. As colunas representam a média de 10 animais e as barras de erro representam o SEM. *, **, *** representam, respetivamente $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$.



Para tentar perceber o porquê de DII4Fc ser mais eficaz no contexto de intervenção tardia, comparámos a densidade vascular de próstatas de murganhos TRAMP não tratados com 24 semanas de idade com a de próstatas de murganhos TRAMP não tratados com 18 semanas de idade. Os resultados mostram que nos murganhos TRAMP com 24 semanas de idade existe um aumento de 30% na densidade vascular tumoral relativamente à dos murganhos com 18 semanas de idade (Figura 28I). Para confirmar se o aumento da densidade vascular resulta de um aumento na ativação endotelial, avaliámos e comparámos os níveis de transcrição de *Vegfa* e *Vegfc* no ARN extraído de amostras de próstatas de murganhos TRAMP não tratados com 24 e 18 semanas de idade. Os resultados confirmaram que tanto *Vegfa*, como *Vegfc*, são mais transcritos às 24 do que às 18 semanas de idade (Figura 28J), o que provavelmente é responsável

pela maior eficácia da monoterapia com sDll4Fc na perturbação da função vascular numa fase mais tardia do desenvolvimento tumoral, justificando assim o aumento da inibição tumoral observado.

4.1.4. A administração combinada de sDll4Fc e doxorrubicina impede o crescimento tumoral

Um estudo recente demonstrou que a terapia anti-angiogénica baseada em VEGF pode reduzir a disponibilidade de agentes quimioterápicos nos tumores. Isto acontece por as terapias anti-angiogénicas baseadas em VEGF conduzirem a alterações da vasculatura tumoral que impedem o aporte e consequentemente a disponibilidade e eficácia de fármacos administrados por via endovenosa no tumor (Van der Veldt et al., 2012).

A administração concomitante de agentes quimioterápicos com fármacos anti-angiogénicos é um protocolo terapêutico comum. Para perceber se o efeito anti-angiogénico da terapia com sDll4Fc poderia afetar a disponibilidade de fármacos quimioterápicos nos tumores, começámos por avaliar o efeito da monoterapia com doxorrubicina no crescimento e vasculatura dos tumores prostáticos de murganhos TRAMP para depois perceber se a sua associação com a terapia anti-Dll4 permitiria obter o mesmo efeito.

Este ensaio foi realizado apenas num contexto de intervenção tardia uma vez que foi aquele em que a monoterapia com sDll4Fc se revelou mais eficaz. Deste modo, as terapias foram administradas a 5 murganhos TRAMP por grupo, entre as 18 e as 24 semanas de idade. Este ensaio também foi repetido.

Às 24 semanas de idade, os murganhos TRAMP tratados apenas com doxorrubicina apresentavam um aumento de 56% do peso prostático (275,9 mg) (Figura 29A) enquanto os murganhos TRAMP não tratados apresentavam um aumento de 149% e os murganhos TRAMP tratados só com sDll4Fc tiveram um aumento de apenas 16% no peso prostático relativamente aos murganhos C57BL/6 (Figura 29A). Assim, isoladamente, a administração de doxorrubicina proporcionou uma inibição do crescimento tumoral na ordem dos 62%, abaixo dos 90% de inibição conseguidos com a administração isolada de sDll4Fc.

Surpreendentemente, os murganhos TRAMP tratados com sDll4Fc em combinação com um regime metronómico de doxorrubicina tiveram um aumento médio de apenas 1% no peso prostático (179mg) relativamente ao dos murganhos C57BL/6 (Figura 29A), uma diferença não significativa e que corresponde a cerca de 99% de inibição do crescimento tumoral (Figura 29A). Às 24 semanas de idade, os animais TRAMP tratados com a combinação apresentavam apenas pequenos tumores cujo estágio histopatológico (adenocarcinomas bem diferenciados) não era diferente do encontrado nos outros grupos teste (dados não apresentados).

Nos tumores prostáticos de murganhos TRAMP tratados apenas com doxorrubicina, a frequência de apoptose aumentou cerca de 41% (Figura 29G) e a frequência de células em proliferação diminuiu cerca de 28% (Figura 29H). A terapia de combinação resultou num efeito mais pronunciado com um aumento de cerca 113% na frequência de apoptose (Figura 29G) e uma redução de cerca 82% na proliferação (Figura 29H), de acordo com o muito maior nível de inibição do crescimento tumoral.

Figura 29 - A terapia com sDII4Fc e doxorrubicina entre as semanas 18 e 24 consegue anular quase totalmente o crescimento tumoral prostático nos murganhos TRAMP. O aumento no peso prostático (A) decorrente do crescimento tumoral é fortemente reduzido quando os murganhos TRAMP são tratados com doxorrubicina apenas (TRAMP+Doxo), mas essa inibição é ainda mais pronunciada com a monoterapia com sDII4Fc (TRAMP + DII4Fc) e a combinação destas duas terapias (TRAMP+Doxo+DII4Fc) é responsável por uma inibição quase total do crescimento tumoral ao ponto de os pesos das próstatas dos animais tratados não ser significativamente diferente dos das próstatas de murganhos C57BL/6. (B) Imagens de imunofluorescência da neo-vasculatura das amostras prostáticas de murganhos controlo (TRAMP), murganhos TRAMP tratados com doxorrubicina e de murganhos TRAMP tratados com doxorrubicina e sDII4Fc, representativas da densidade vascular (anticorpo anti-PECAM, verde) e da maturidade vascular (anticorpo anti- α -SMA, vermelho), da densidade vascular (anticorpo anti-PECAM, vermelho) e da perfusão (Lectina, verde) e da densidade vascular (anticorpo anti-PECAM, verde) e extravasação (Evans Blue, vermelho). Os núcleos estão contrastados com DAPI.

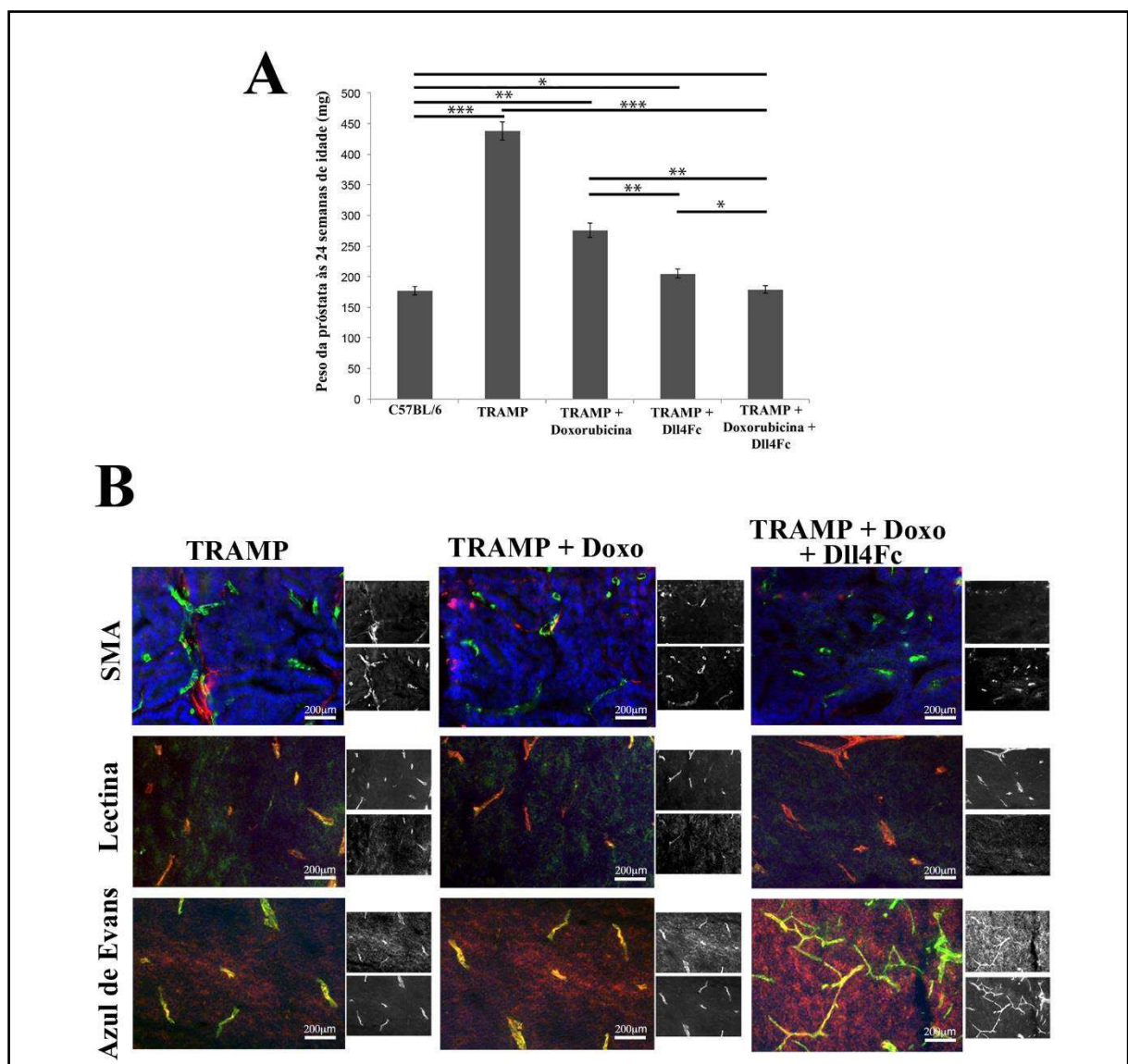
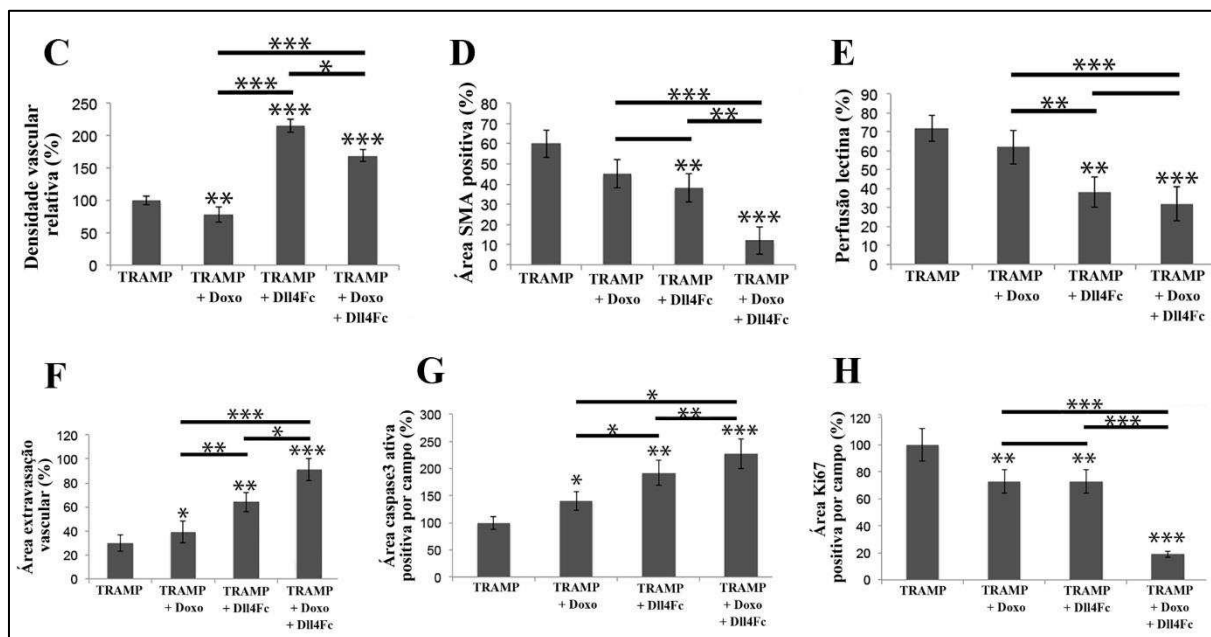


Figura 29 (continuação) - A terapia com sDII4Fc e doxorubicina entre as semanas 18 e 24 é altamente eficaz na redução do crescimento tumoral prostático nos murganhos TRAMP. Relativamente aos controlos (TRAMP), a terapia com doxorubicina (TRAMP + Doxo) levou a uma redução e a terapia com sDII4Fc (TRAMP + DII4Fc) a um aumento significativo da densidade vascular (C), enquanto o revestimento por células de músculo liso (D) está mais reduzido nos tumores prostáticos de murganhos TRAMP tratados com sDII4Fc do que com doxorubicina. Ambas as monoterapias reduzem a perfusão vascular (E) e aumentam os níveis de extravasação (F), contudo o efeito de sDII4Fc é mais pronunciado. O mesmo efeito pode ser observado na frequência de células apoptóticas (G) que se apresenta aumentada com ambas as monoterapias, enquanto a frequência de células em proliferação (H) está igualmente reduzida. Relativamente à monoterapia com sDII4Fc, a administração combinada de sDII4Fc e de doxorubicina (TRAMP + Doxo + DII4Fc) levou ao desenvolvimento de uma neovascularização tumoral de densidade (C) ligeiramente inferior (ainda assim significativamente maior que a dos controlos (TRAMP)) com uma acentuada diminuição do revestimento por células de músculo liso (D) mas a níveis de perfusão vascular semelhantes (E), contudo a extravasação vascular foi significativamente superior (F). A frequência de células apoptóticas (G) encontra-se ligeiramente aumentada enquanto a frequência de células em proliferação (H) é acentuadamente diminuída nas próstatas dos murganhos TRAMP tratados com a combinação sDII4Fc e doxorubicina. As colunas representam a média de 10 animais e as barras de erro representam o SEM. *, **, *** representam, respetivamente $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$.



Enquanto a terapia metronómica com doxorubicina produziu um efeito anti-angiogénico, com uma diminuição de 22% na densidade vascular (Figura 29B, C) e uma redução de 25% no revestimento por células murais (Figura 29B, D), a terapia de combinação com sDII4Fc conduziu a um aumento de 69% na densidade vascular (Figura 29B, C) e uma redução de 80% no revestimento por células murais (Figura 29B, D).

Em termos funcionais, a intervenção tardia com doxorubicina, isoladamente, permitiu uma redução de cerca 14% da perfusão vascular tumoral (Figura 29B, E) enquanto a extravasação vascular tumoral aumentou cerca de 30% relativamente à das próstatas de murganhos TRAMP não tratados (Figura 29B, F). A terapia de combinação conduziu a uma redução de cerca 56% na perfusão vascular tumoral (Figura 29B, E) e, pelo contrário, a um aumento de cerca 200%

da extravasação vascular tumoral à das próstatas de murganhos TRAMP não tratados (Figura 29B, F).

4.1.5. A terapia com sDll4Fc promove uma neo-vascularização não-funcional mas aumenta a disponibilidade dos fármacos no tumor

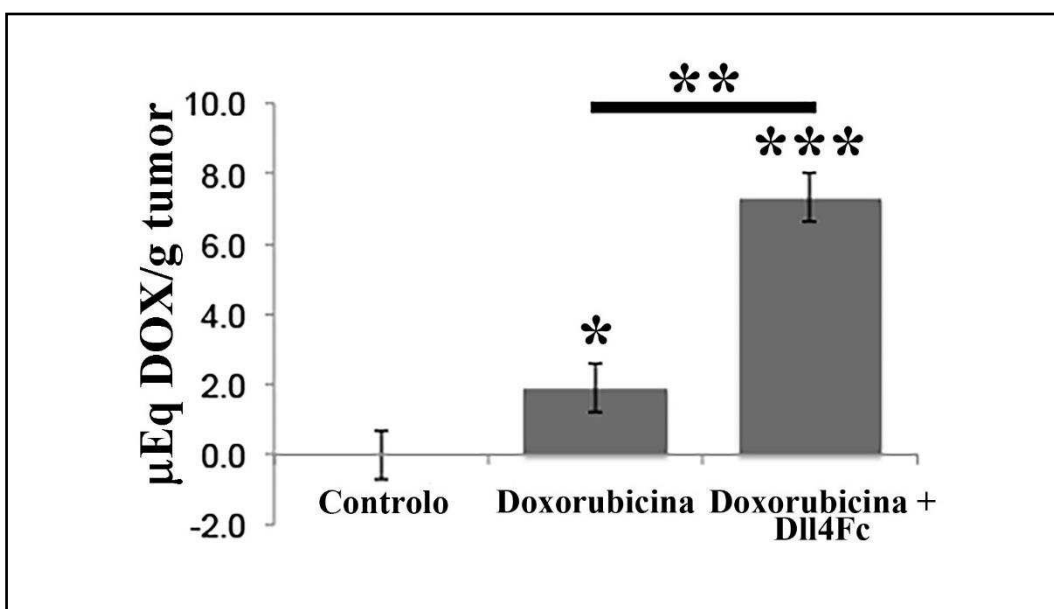
As terapias anti-Dll4 são conhecidas por produzir um fenótipo pró-angiogénico com redução da funcionalidade conduzindo a um aumento da hipóxia e redução do crescimento tumoral.

Assim, a administração de sDll4Fc parece ser mais eficaz quando existe um processo angiogénico ativo a decorrer e maior densidade vascular, isto é, às 24 semanas de idade.

Mas, no contexto de terapia combinada, a disrupção vascular por si só não explica o aumento de eficácia observado. De fato, os níveis de perfusão vascular não foram significativamente diferentes dos encontrados no contexto de intervenção tardia com Dll4Fc apenas. Por outro lado, a extravasação vascular apresentou-se bastante aumentada, o que poderia levar a alterações na concentração intratumoral de doxorubicina, as quais poderiam explicar a maior eficácia terapêutica obtida com o tratamento de combinação.

A avaliação da concentração de doxorubicina no tumor veio revelar que a terapia combinada aumenta em 3,8 vezes a concentração de doxorubicina dentro da próstata quando comparada com a monoterapia com doxorubicina, apesar do fenótipo angiogénico (Figura 30).

Figura 30 - A administração combinada de sDll4Fc e doxorubicina aumenta a concentração de doxorubicina no meio tumoral. A doxorubicina tumoral total foi quantificada (microequivalentes de doxorubicina (DOX) total por grama de tecido) através de um método fluorométrico. A administração combinada de Dll4Fc com doxorubicina permitiu obter 3,8× mais doxorubicina na massa tumoral comparativamente à administração de doxorubicina isoladamente. As colunas representam a média de 10 animais e as barras de erro representam o SEM. *, **, *** representam, respetivamente $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$.



4.1.6. A terapia combinada com sDll4Fc potencia o efeito imunomodulador tumoricida da doxorubicina

A quimioterapia tem um conhecido efeito imunodepressor, uma questão que causa grande preocupação médica uma vez que está relacionada com o aumento da morbidade dos pacientes (Zitvogel, Apetoh, Ghiringhelli, & Kroemer, 2008).

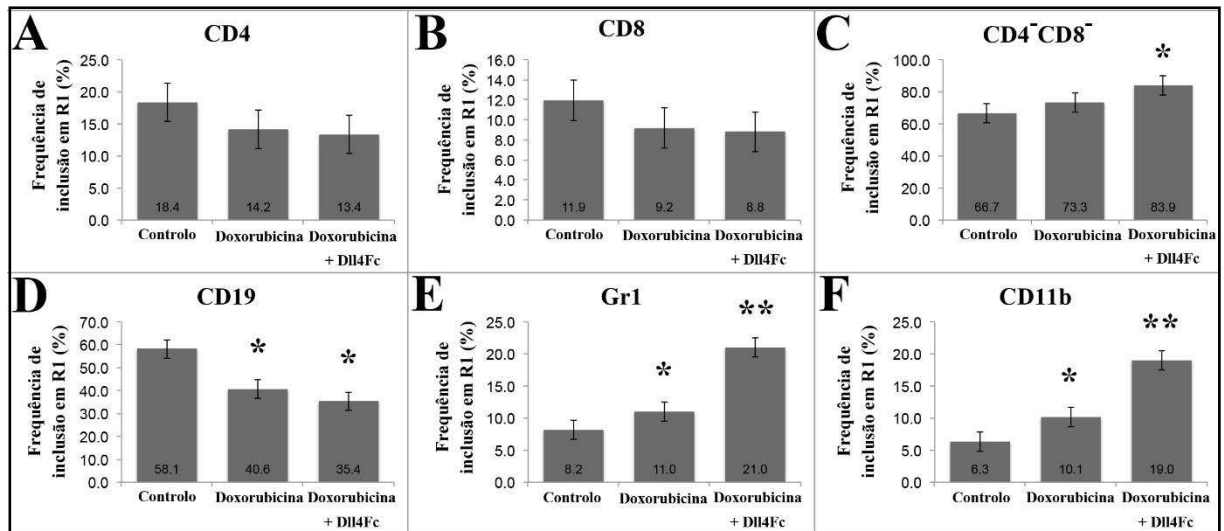
A doxorubicina é uma antraciclina clássica usada como quimioterápico (Johansen, 1981). Sabe-se que a doxorubicina desempenha a sua ação tumoricida não só através de efeitos diretos nas células tumorais, mas também por desempenhar funções imunomoduladoras que ajudam a reduzir o tamanho tumoral. Esta função imunomoduladora implica a potenciação das respostas imunitárias por linfócitos T citotóxicos e da atividade tumoricida dos macrófagos (Apetoh, Mignot, Panaretakis, Kroemer, & Zitvogel, 2008; Haskill, 1981; Maccubbin et al., 1992).

Para discernir se a terapia de combinação com Dll4Fc tem maior a eficácia terapêutica por também afetar esta função imunomoduladora da doxorubicina, medimos a frequência das populações celulares imunitárias esplénicas. As frequências linfocitárias foram avaliadas por contagem citométrica de células CD4+, CD8+ e CD19+, isto é, linfócitos T *helper*, T citotóxicos e linfócitos B, respetivamente.

As frequências linfocitárias dos murganhos TRAMP tratados com terapia de combinação não se apresentavam significativamente reduzidas quando comparadas com as de murganhos TRAMP tratados só com doxorubicina, mas estavam ambas significativamente reduzidas quando comparadas com as dos murganhos TRAMP não tratados (Figura 31 A-D).

As populações de granulócitos/monócitos foram estimadas por contagem dos esplenócitos Gr1+ e CD11b+. Contrariamente aos resultados das contagens linfocitárias, as populações de granulócitos/monócitos dos murganhos TRAMP tratados com a terapia de combinação apresentavam-se significativamente aumentadas comparativamente às dos murganhos TRAMP tratados só com doxorubicina (Figura 31 E, F).

Figura 31 - A administração combinada de sDII4Fc e doxorrubicina potencia um aumento das células granulocíticas/monocíticas que medeiam a função da doxorrubicina. A análise por citometria de fluxo de populações de esplenócitos revelou que as frequências de linfócitos T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) e de linfócitos B CD19⁺ (D) não apresentavam diferenças significativas entre os baços colhidos de animais tratados só com doxorrubicina e os colhidos de animais tratados com a combinação com DII4Fc (Doxorubicina + DII4Fc). A frequência de células CD4⁺CD8⁺ (C) apresentou-se significativamente aumentada tanto nos animais tratados com doxorrubicina apenas como nos tratados com a combinação com DII4Fc. As populações de granulócitos/monócitos Gr1⁺ (E) e CD11b⁺ (F) apresentam-se significativamente aumentadas nos animais tratados com a terapia de combinação relativamente às dos animais tratados com doxorrubicina apenas. As colunas representam a média de 10 animais e as barras de erro representam o SEM. * e **, representam, respetivamente p < 0,05 e p < 0,01.



4.2. Estabelecimento de um modelo murino de metastização para o estudo da função endotelial do ligando Dll4 no processo metastático

A linha celular de melanoma murino B16-F10 é uma linha celular neoplásica altamente metastática em contexto singênico. Apesar de este potencial metastático ter sido evidenciado sobretudo em ensaios de metastização experimental (inoculação endovenosa na veia da cauda para desenvolvimento de metástases pulmonares), outros autores referem o desenvolvimento de metástases espontâneas, sobretudo nos pulmões e linfonodos, a partir de tumores primários formados após inoculação subcutânea, realizando (L. Chen et al., 2009; Dawson et al., 2009; Hawkins et al., 2002; Nathanson et al., 1986; Poste, 1982), ou não (Bobek et al., 2010, 2011; Jean et al., 2014; Salinas-Jazmín et al., 2010; Shrayar, Bogaars, Hearing, Maizel, & Wanebo, 1995; Skuli et al., 2009), cirurgia para a remoção do tumor primário.

A implantação intradérmica de células B16-F10 tem sido utilizada sobretudo para avaliar aspetos relativos ao tumor primário e o efeito de novos agentes terapêuticos (Akiyama et al., 2000; Baird et al., 2013; Burghoff et al., 2014; Capozza et al., 2012; Dua et al., 2007; L. H. et al., 2015; Hawkins et al., 2002; Y. Huang et al., 2009; Seguin et al., 2012; Zigrino et al., 2009); contudo, foi já demonstrado que este modelo metastiza espontaneamente para os linfonodos regionais realizando (Neville & Pezzella, 1994) ou não (Morris et al., 2013; Trites et al., 2000) cirurgia para remoção do tumor primário.

Com o objetivo de conseguir estudar o papel do ligando Dll4 nas várias etapas da metastização, começámos por tentar estabelecer um modelo de metastização espontânea com células B16-F10 de melanoma murino em murganhos C5BL/6 *WT*. Para tal realizámos quer implantes subcutâneos quer implantes ortotópicos.

Caso um destes modelos fosse validado nas nossas condições experimentais, o objetivo seguinte seria testar o efeito da terapia anti-Dll4 (já referida no capítulo II) na metastização. Além disso iríamos ainda testar o efeito da deleção genética de Dll4, especificamente no endotélio, no processo metastático; para isso o modelo de metastização espontânea previamente validado iria ser realizado em murganhos transgênicos *Dll4^{lox}-VE-cadherin-Cre-ER^{T2}* para assim discernir o efeito do bloqueio generalizado da sinalização Notch por Dll4 (com o sDll4Fc) do efeito especificamente endotelial.

4.2.1. Transplantes singênicos subcutâneos

A implantação subcutânea de células neoplásicas é tecnicamente bastante simples, e era uma prática já habitual no laboratório de acolhimento, tendo sido essa a principal razão que nos levou a começar por este modelo de metastização espontânea.

Além disso, diversos autores referem o desenvolvimento de metástases espontâneas a partir da implantação subcutânea de células B16-F10 na almofada plantar (A. J. Chien et al., 2009; Hawkins et al., 2002; Murakami et al., 2002; Nathanson et al., 1986), no pavilhão auricular (Bobek et al., 2010; Jean et al., 2014), na cauda (Bobek et al., 2011; Shroyer et al., 1995) e no flanco (Salinas-Jazmín et al., 2010; Skuli et al., 2009). Contudo, não está descrita a implantação subcutânea no flanco, seguida da remoção cirúrgica do tumor primário para promover o desenvolvimento de metástases.

De acordo com o que está descrito para o modelo de implantação subcutânea na almofada plantar (L. Chen et al., 2009; Dawson et al., 2009), no primeiro ensaio decidimos realizar as cirurgias de remoção do tumor primário 21 dias após a implantação (Tabela 1). Este momento está condicionado a um compromisso entre o bem-estar animal e o tempo necessário para que uma quantidade suficiente de células neoplásicas se dissemine a partir do tumor primário e se estabelece nos locais metastáticos. Além disso, está descrita uma correlação direta entre o aumento do tamanho do tumor primário e a incidência de metástases nos linfonodos regionais e pulmões (Nathanson et al., 1986).

No primeiro ensaio verificamos que, apesar de o inóculo inicial ser igual (2×10^5 células B16-F10), o volume tumoral 21 dias após a inoculação variou entre 783 mm^3 e 1457 mm^3 (Tabela 2). A remoção cirúrgica destes tumores revelou-se muito difícil uma vez que já existiam extensas áreas de necrose que tornavam a massa tumoral extremamente friável e hemorrágica. De fato, neste primeiro ensaio, dos quatro animais intervencionados apenas sobreviveu aquele que no dia da cirurgia tinha o menor volume tumoral (783 mm^3). Este animal que sobreviveu à cirurgia foi sacrificado 19 dias depois pois já apresentava um novo tumor primário no local que havia sido intervencionado. A necropsia revelou a presença de metástases apenas nos linfonodos axilar e inguinal direitos possivelmente por contacto com o novo tumor primário ou devido a disseminação de células neoplásicas durante a cirurgia.

No segundo ensaio decidimos que a cirurgia seria realizada em todos os animais quando um deles alcançasse o volume tumoral do animal que sobreviveu no primeiro ensaio. Assim, 19 dias após a inoculação, um dos animais tinha um tumor primário com 767 mm^3 , mas os restantes tinham tumores muito mais pequenos (Tabela 2), apesar de o inóculo inicial ser também igual (2×10^5 células B16-F10). Apesar de os volumes tumorais individuais terem sido inferiores aos verificados no primeiro ensaio, dos cinco animais intervencionados, três sobreviveram à cirurgia, tendo morrido mais uma vez o animal com o maior volume tumoral (767 mm^3), mas morreu também um animal que tinha um tumor com apenas 408 mm^3 . Neste segundo ensaio, os três animais que sobreviveram à cirurgia foram sacrificados 14 dias depois pois já tinham desenvolvido um novo tumor primário no local da sutura. Na necropsia verificou-se que este

novo tumor primário se estendia também intra-abdominalmente, nos três animais. Num destes três animais (o que tinha um tumor primário com 196 mm³ no momento da cirurgia) existiam metástases pulmonares (8 colônias) e num outro (o que tinha um tumor primário com apenas 50 mm³ no momento da cirurgia) existiam num dos linfonodos, mas assumimos que estas metástases se tenham desenvolvido por contato direto do tumor primário com o diafragma e consequentemente com a pleura. O desenvolvimento do novo tumor primário intra-abdominal possivelmente deveu-se a uma rutura accidental da parede muscular abdominal durante o procedimento cirúrgico.

Tabela 1 – Modelo de metastização espontânea por implantação subcutânea. Descrição detalhada das condições de cada ensaio. Foram implantadas 1×10^5 células B16-F10 subcutaneamente no flanco direito. N - Número de animais intervencionados; CX - Cirurgia; V - Volume do tumor primário em mm³ no dia da cirurgia, [mínimo - máximo]; N_{surv} - número de animais que sobreviveram à cirurgia; LN – linfonodos.

Ensaio #	N	Dias até CX	V (mm ³)	N _{surv}	Dias após CX até sacrifício	Novo tumor primário	Metástases pulmonares	Metástases LN
1	4	21	[783 - 1457]	1	19	1/1	Não	1/1
2	5	19	[50 - 767]	3	14	3/3	1/3	1/3
3	9	17	[53 - 1277]	4	27	2/4	1/4	Não
4	2	22	[132 - 159]	2	30	2/2	Não	Não
5	2	10	[61 - 68]	2	16 e 26	1/2	Não	Não
6	4	12	[86 - 128]	2	16 e 26	2/2	Não	1/2
7	5	14	[56 - 116]	5	15	3/5	Não	Não

Tabela 2 – Volume tumoral (em mm³) de cada animal intervencionado cirurgicamente em cada ensaio de metastização espontânea por implantação subcutânea de células B16-F10. A verde estão assinalados os volumes tumorais dos animais que sobreviveram à cirurgia e a vermelho os volumes dos que não sobreviveram. Os volumes assinalados no interior de um retângulo verde correspondem aos volumes tumorais dos animais que desenvolveram metástases pulmonares.

		Ensaio #						
		1	2	3	4	5	6	7
V individuais	783	50	53	132	61	86	56	
	1170	196	115	159	68	93	66	
	1214	408	130			118	67	
	1457	412	375			128	70	
		767	451				116	
			817					
			879					
			1068					
		1277						

No terceiro ensaio tivemos mais animais disponíveis, nove no total, e decidimos à partida esperar menos tempo até à cirurgia. Dezassete dias após a inoculação de 2×10^5 células B16-F10 em todos os animais, mais uma vez verificámos volumes tumorais primários altamente variáveis com um mínimo de 53 mm³ e um máximo de 1277 mm³. Dos nove animais intervencionados cirurgicamente apenas sobreviveram quatro, tendo morrido os animais que

tinham os maiores volumes tumorais no momento da cirurgia. Mesmo assim, um animal que tinha um tumor primário com 879 mm³ sobreviveu e um animal que tinha um tumor primário com apenas 375 mm³ morreu, sendo esta uma observação que dificultou bastante o estabelecimento de uma correlação entre o volume tumoral no momento da cirurgia e a mortalidade associada. O animal que tinha o maior volume tumoral primário (879 mm³) e que sobreviveu à cirurgia foi também aquele que apresentava metástases pulmonares (270 colônias). Contudo, mais uma vez, também tinha um novo tumor primário no local da sutura que se estendia intra-abdominalmente. É de salientar que neste ensaio, dois dos quatro animais intervencionados não desenvolveram um novo tumor primário (Tabela 1) mas também não tinham metástases pulmonares ou nos linfonodos 27 dias após a cirurgia.

No quarto ensaio tínhamos disponíveis apenas dois animais. Vinte e dois dias após a implantação estes dois animais tinham tumores primários bastante pequenos (132 e 159 mm³) contrastando com o que tínhamos verificado nos ensaios anteriores, em que num menor período de tempo tivemos animais a desenvolver tumores primários com volumes na ordem dos 1000 mm³. Os dois animais deste ensaio sobreviveram à cirurgia, mas trinta dias depois tinham também um novo tumor primário (apenas no local da sutura) e não apresentavam metástases.

No quinto ensaio, mais uma vez com dois animais apenas, assumindo que o maior volume tumoral seria a causa da mortalidade e da recorrência associadas à cirurgia, decidimos aguardar ainda menos tempo para realizar a cirurgia. Assim, 10 dias após a implantação da mesma quantidade de células B16-F10, estes animais tinham tumores primários com apenas 61 e 68 mm³. Ambos sobreviveram à cirurgia, mas um deles desenvolveu um novo tumor primário ulcerado na linha da sutura, tendo sido por isso sacrificado apenas 16 dias após a cirurgia. O outro animal, que não desenvolveu novo tumor primário, foi sacrificado 26 dias depois. Nem um nem outro tinham metástases.

No sexto ensaio, inoculámos subcutaneamente 4 animais. Como no ensaio anterior não tínhamos verificado o aparecimento de metástases, assumimos que seria necessário esperar um pouco mais de tempo para permitir que o tumor primário disseminasse mais células neoplásicas. Assim, as cirurgias foram realizadas 12 dias após a implantação. Apesar dos pequenos volumes tumorais (86 a 128 mm³), dos quatro animais intervencionados apenas sobreviveram dois, o que tinha o menor volume tumoral (86 mm³) e o que tinha maior volume tumoral (128 mm³), não se verificando mais uma vez uma relação entre o volume tumoral e a mortalidade associada à cirurgia. O animal que tinha maior volume tumoral e sobreviveu à cirurgia foi sacrificado 16 dias depois e o que tinha menor volume tumoral foi sacrificado 26 dias depois; ambos tinham um novo tumor primário subcutâneo sem invasão da cavidade abdominal. Apenas foi possível

verificar o aparecimento de metástases nos linfonodos do animal que foi sacrificado 26 dias depois da cirurgia.

No sétimo ensaio, 14 dias após a inoculação das B16-F10, os cinco animais apresentavam tumores com volumes entre 56-116 mm³. Todos os animais sobreviveram à cirurgia. Dos 5 animais, 3 acabaram por desenvolver um novo tumor primário no local da sutura. Estes 3 animais foram por isso sacrificados 15 dias depois da cirurgia. Nenhum apresentava metástases. Os outros dois animais que não desenvolveram novo tumor primário, foram sacrificados apenas 3 meses depois da cirurgia; contudo, na necropsia não verificámos a presença de metástases.

4.2.2. Transplantes singénicos ortotópicos (intradérmicos)

Tendo em conta o fracasso do modelo de metastização espontânea por implantação subcutânea no flanco, decidimos tentar a implantação ortotópica dadas as vantagens já mencionadas deste tipo de modelo de metastização.

Apesar de não estar descrita a formação espontânea de metástases pulmonares a partir de uma localização ortotópica das B16-F10, tentámos averiguar se tal seria possível. Uma vez que o melanoma maligno espontâneo tem origem nos melanócitos da pele, inoculámos células B16-F10 intradermicamente, no flanco direito, tentando dessa forma proporcionar condições que teoricamente mimetizam melhor a progressão espontânea dos melanomas. De acordo com o que está descrito na literatura (Cornil, Man, Fernandez, & Kerbel, 1989) verificámos o desenvolvimento de uma massa tumoral fortemente pigmentada, com mobilidade associada à mobilidade da pele (Figura 32).

Figura 32 - Aspeto do tumor primário 15 dias após implantação intradérmica de 3×10^4 células B16-F10 num murganho C57BL/6.



Foram realizados dois ensaios independentes de implantação intradérmica de células B16-F10 no flanco de murganhos C57BL/6. As condições e os resultados de cada ensaio estão descritos detalhadamente na tabela 3.

Tabela 3 – Modelo de metastização espontânea por implantação intradérmica. Descrição detalhada das condições de cada ensaio. Σ B16-F10 – total de células de melanoma murino B16-F10 implantadas intradermicamente; N - Número de animais intervencionados; CX - Cirurgia; V - Volume do tumor primário em mm³ no dia da cirurgia, [mínimo - máximo]; N_{surv} - número de animais que sobreviveram à cirurgia; LN - linfonodos.

Ensaio #	Σ B16-F10	N	Dias até CX	V	N _{surv}	Dias após CX até sacrifício	Novo tumor primário	Metástases pulmonares	Metástases LN
1	3×10^4	3	15	[754 - 1025]	3	18	3/3	Não	Não
2	5×10^4	3	11	[704 - 858]	3	18	3/3	Não	Não

No primeiro ensaio, utilizámos apenas três murganhos (machos) e um inóculo celular bastante inferior ao utilizado por outros autores (entre 1×10^5 e 5×10^6) para estudar apenas o tumor primário nesta localização (Akiyama et al., 2000; Capozza et al., 2012; Dua et al., 2007; Y. Huang et al., 2009). Foram duas as razões para utilizar um menor inóculo. Primeiro pretendíamos ter um tempo de desenvolvimento do tumor primário que permitisse a disseminação de uma quantidade suficiente de células neoplásicas sem comprometer o bem-estar dos animais; segundo, como já tínhamos verificado no modelo de implantação subcutânea a existência de uma maior mortalidade associada à cirurgia quando os tumores intervencionados ultrapassavam os 350-450 mm³ assumimos que usando um inóculo menor obteríamos tumores menores.

Todavia, verificámos no primeiro ensaio que, usando apenas 3×10^4 células B16-F10, 15 dias depois da inoculação intradérmica os animais tinham tumores primários com volumes entre 754 e 1091 mm³ (Tabela 4).

Tabela 4 - Volume tumoral (em mm³) de cada animal intervencionado cirurgicamente em cada ensaio de metastização espontânea por implantação intradérmica de células B16-F10.

	Ensaio #	
	1	2
V individuais	754	704
	1025	795
	1091	858

Apesar do volume tumoral, todos os animais sobreviveram à intervenção cirúrgica, mas também todos desenvolveram um novo tumor primário no local da sutura, tendo sido sacrificados 18

dias depois da cirurgia. Na necropsia não verificamos a presença de metástases quer nos linfonodos regionais quer nos pulmões.

Assumindo que teria sido o pequeno inóculo celular a razão para não verificarmos o desenvolvimento de metástases no primeiro ensaio, no segundo ensaio decidimos utilizar um inóculo celular superior (5×10^4) e realizar a cirurgia a todos quando um dos animais tivesse desenvolvido um tumor primário com um volume de 850 mm^3 , uma vez que no primeiro ensaio não verificamos a existência de mortalidade associada à remoção de tumores com dimensões superiores. As cirurgias foram assim realizadas 11 dias depois da inoculação intradérmica quando os animais tinham tumores primários com volumes entre 704 e 858 mm^3 (Tabela 4). Em todos os animais surgiu um novo tumor primário no local da sutura e não se verificou a existência de metástases 18 dias depois da cirurgia.

4.2.3. Modelo de metastização experimental

Uma vez que nas condições experimentais descritas não conseguimos verificar a formação consistente e reprodutível de metástases espontâneas, após a implantação tanto subcutânea como intradérmica das células B16-F10, mesmo realizando cirurgia para remoção do tumor primário, decidimos utilizar o modelo de metastização experimental com células de melanoma murino B16-F10, amplamente utilizado por outros (Burghoff et al., 2014; a Gautam et al., 2002; Lee, Ryu, Ji, Kang, & Moon, 2015; Seguin et al., 2012; Shi, Parhar, Zou, Al-Mohanna, & Paterson, 2002). O número de células B16-F10 usadas e o tempo para avaliar o desenvolvimento de macrometástases variam entre autores, desde 1×10^4 (Chung et al., 2012) a 1×10^6 células (Y. Takeda et al., 2011b) e de 10 (Burghoff et al., 2014) a 30 dias (Y. Shi et al., 2002).

Assim, mesmo não nos permitindo avaliar o papel endotelial do ligando Dll4 nas etapas iniciais da metastização, abandonamos o modelo de metastização espontânea e adotamos o modelo de metastização experimental, que pelo menos poderia vir a elucidar esse papel nas etapas de extravasação e colonização metastática. Para tal, inoculamos 2×10^5 células B16-F10 na veia da cauda e 18 dias depois sacrificamos os animais para quantificar o número de colônias metastáticas nos pulmões.

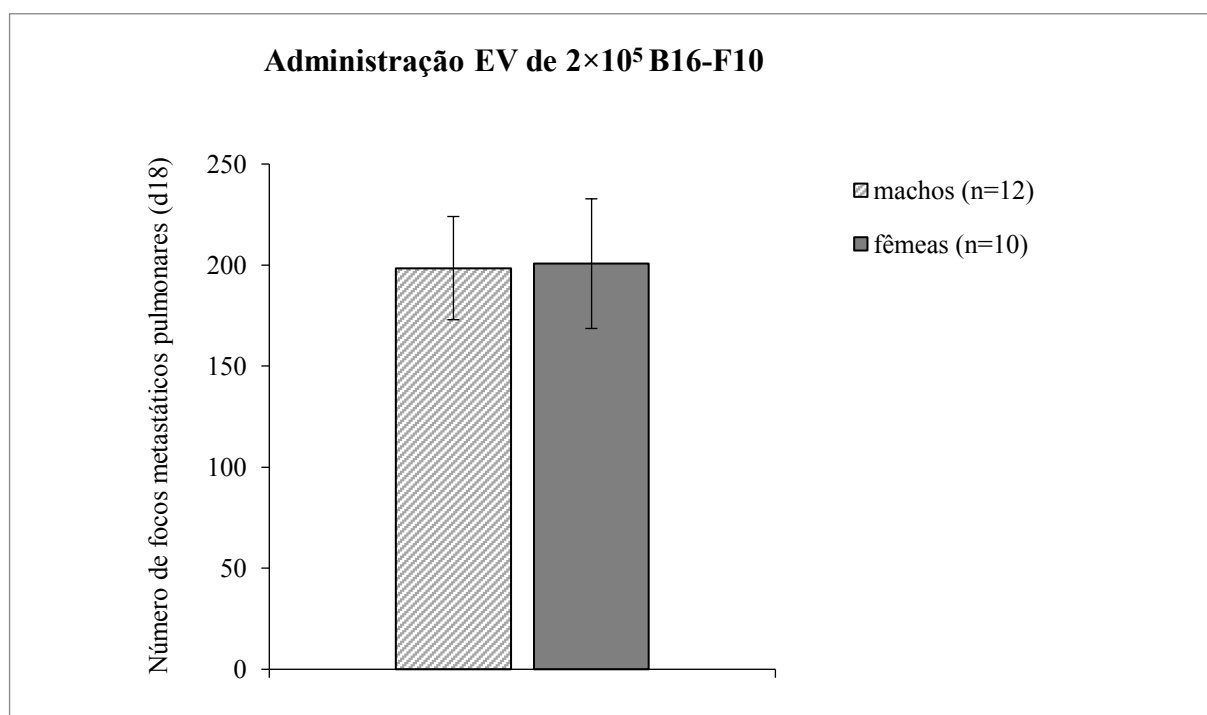
4.2.3.1. O número de metástases pulmonares é semelhante entre machos e fêmeas

Tal como nos ensaios de metastização espontânea, começamos por implementar este modelo em murganhos C57BL/6 *WT* para avaliar eventuais limitações das nossas condições experimentais e também qual o número médio de metástases expectável.

Como está descrito um efeito do género neste tipo de modelo de metastização (Welch, 1997), decidimos realizar dois ensaios, um em que usámos murganhos fêmea e um em que usámos murganhos macho. Cada um destes ensaios foi repetido mais uma vez.

Ao contrário do que foi verificado por outros (Proctor, Yamamura, Gaydos, & Mastromatteo, 1981), nas nossas condições experimentais não obtivemos diferenças significativas ($p = 0,929$) entre o número médio de metástases pulmonares enumeradas nos machos (199 (51)) e nas fêmeas (201 (64)), 18 dias após a inoculação endovenosa na veia da cauda de 2×10^5 células B16-F10 (Figura 33).

Figura 33 - Modelo de metastização experimental em murganhos C57BL/6. Número médio de focos metastáticos pulmonares em machos e fêmeas da estirpe C57BL/6 18 dias após administração endovenosa (EV) de 2×10^5 células de melanoma murino B16-F10. As colunas representam a média e as barras de erro representam o desvio padrão. n – número total de murganhos de cada género usados.



4.2.3.2. A perda-de-função do ligando Dll4 ao nível do endotélio conduz a um número significativamente inferior de macrometástases pulmonares

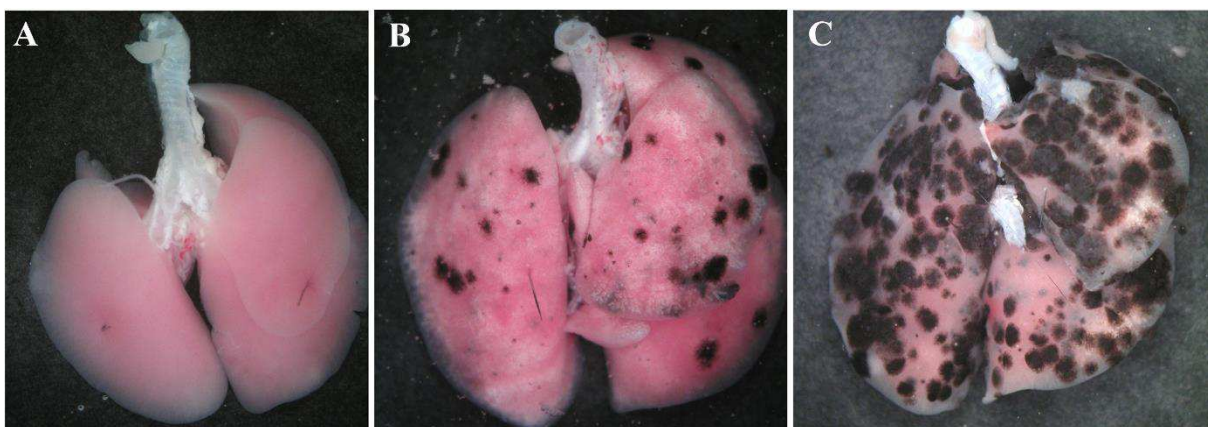
Como os dois ensaios de metastização experimental realizados em murganhos C57BL/6 *WT* apresentaram resultados reprodutíveis com variâncias semelhantes entre grupos e como não se verificaram diferenças significativas entre machos e fêmeas, decidimos usar este modelo nos murganhos transgênicos *Dll4^{lox/wt} -VE-cadherin-Cre-ER^{T2}*.

Foram realizados dois ensaios independentes. No primeiro usámos 10 animais: 5 *Cre*⁺ (2 machos e 3 fêmeas) e 5 *Cre*⁻ (2 machos e 3 fêmeas). No segundo usámos 12 animais: 6 *Cre*⁺ (4

machos e 2 fêmeas) e 6 Cre⁻ (4 machos e 2 fêmeas). Todos eles foram administrados diariamente com 1 mg de tamoxifeno durante 5 dias consecutivos uma semana antes da inoculação das células B16-F10.

Em ambos os ensaios verificamos que as fêmeas (quer Cre⁺ quer Cre⁻) tinham em média menos metástases que os machos com genótipo correspondente. As fêmeas Cre⁺ tiveram em média 17(5) focos metastáticos enquanto que os machos Cre⁺ tiveram em média 108 (63) focos metastáticos, uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0109$). Do mesmo modo, as fêmeas Cre⁻ tiveram em média 46 (27) focos metastáticos pulmonares enquanto que os machos Cre⁻ tiveram em média 196 (51), uma diferença também estatisticamente significativa ($p = 0,0002$). É de salientar que, no caso dos animais transgênicos Cre⁻ eram esperados resultados semelhantes aos observados em murganhos C57BL/6 *WT*. Apesar de, tal como esperado, o número de focos metastáticos nos machos Cre⁻ (196 (51)) ter sido semelhante ao dos machos *WT* (199 (51)), as fêmeas Cre⁻ apresentaram um número de focos metastáticos 46 (27) significativamente inferior ($p = 0,0002$) ao número de focos metastáticos das fêmeas *WT* (201 (64)), sugerindo assim um efeito do tamoxifeno específico do género (Figura 34).

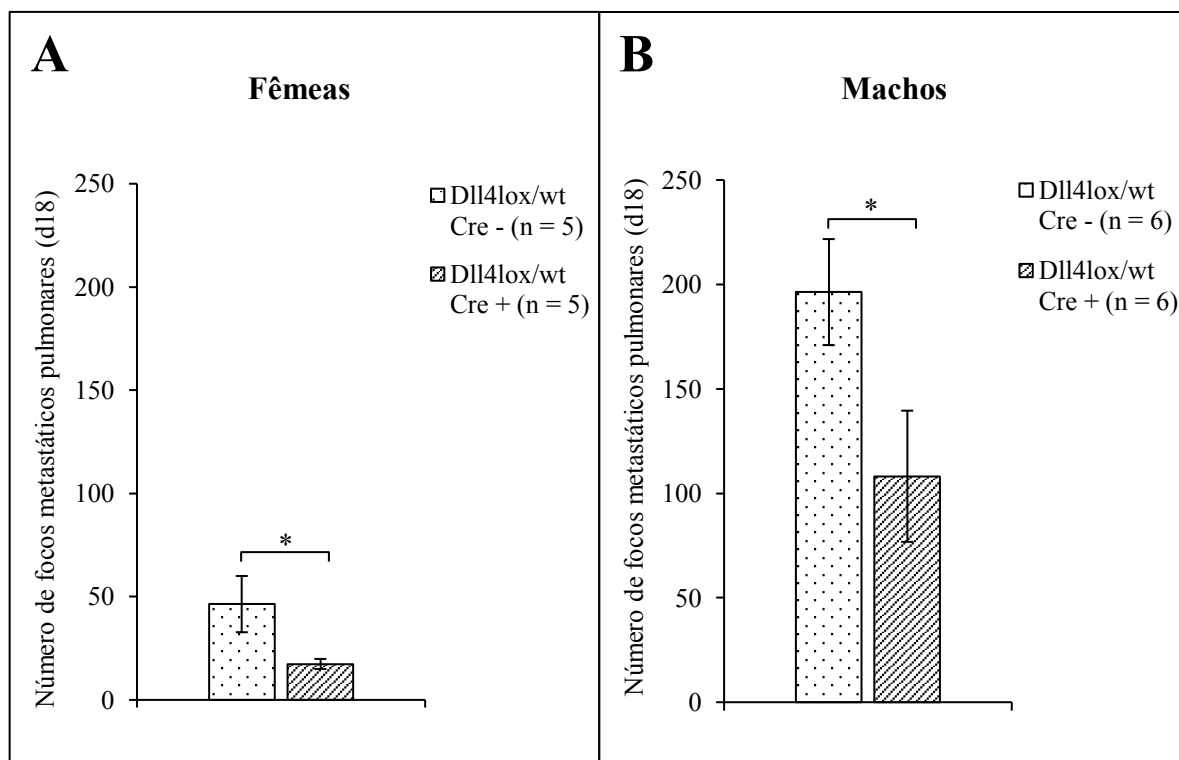
Figura 34 - A administração de tamoxifeno leva ao desenvolvimento de menos macrometástases pulmonares nos murganhos fêmea. Aspetto dos pulmões (face dorsal) de (A) um murganho fêmea C57BL/6 *WT* não inoculado com células B16-F10 e de (B) murganhos fêmea *Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre⁻-ER^{T2}* e (C) C57BL/6 *WT*, 18 dias após a inoculação com 2×10^5 células B16-F10 na veia da cauda.



Considerando as diferenças entre machos e fêmeas transgênicos, para perceber o efeito da deleção de um alelo do gene *Dll4* especificamente no endotélio, agrupámos e analisamos os dados por género. Assim, no caso das fêmeas (Figura 35A), 18 dias após a inoculação endovenosa na veia da cauda de 2×10^5 células B16-F10, verificámos uma média de 46 (27) focos metastáticos pulmonares nas Cre⁻ e de 17 (5) nas Cre⁺, uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0367$), que corresponde a uma redução de 63% do número de focos metastáticos nas fêmeas que são heterozigóticas para *Dll4* a nível do endotélio. No caso dos machos (Figura 35B), o mesmo procedimento levou ao desenvolvimento em média de 196 (51)

focos metastáticos pulmonares nos Cre⁻ e de 108 (63) nos Cre⁺, uma diferença também estatisticamente significativa ($p = 0,023$), que corresponde a uma redução de 45% do número de focos metastáticos nos machos que são heterozigóticos para Dll4 a nível do endotélio.

Figura 35 - Modelo de metastização experimental em murganhos transgênicos *Dll4^{lox/wt}-VE-cadherin-Cre-ER^{T2}*. Número médio de focos metastáticos pulmonares em fêmeas (A) e machos (B) com (Cre⁺) ou sem (Cre⁻) a deleção de um alelo Dll4 especificamente no endotélio, 18 dias após administração endovenosa (EV) de 2×10^5 células de melanoma murino B16-F10. As colunas representam a média e as barras de erro representam o desvio padrão. * $p < 0,05$. n – número total de murganhos de cada genótipo usados.



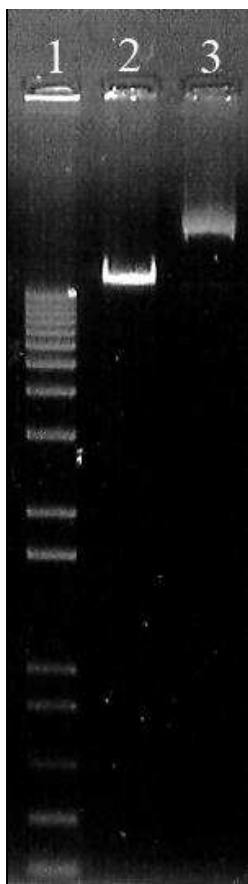
Os resultados deste ensaio sugerem assim uma função para o ligando endotelial Dll4 no desenvolvimento de micro para macrometástases ou no processo de extravasação nos capilares pulmonares. Além disso, a administração de tamoxifeno parece também ter influência nestes dois processos, mas apenas nos murganhos fêmea (Figura 34).

4.3. Produção de uma nova linha de murganhos com perda-de-função condicional e induzível da Tetraspanin18

4.3.1. Vetor

Tal como foi referido em 3.5.1.4, o vetor Tspan18cKO (Figura 14), tem apenas um local de reconhecimento para a enzima *NotI* pelo que, a digestão da forma circular do vetor com esta endonuclease de restrição, resulta na sua linearização. Na figura 36 é possível observar a imagem de um gel de agarose (veja-se 3.6.2) onde foi aplicado, da esquerda para a direita, o marcador de pesos moleculares 1Kb+ DNA ladder (anexo I), uma amostra de vetor Tspan18cKO digerido com *NotI* e uma amostra de vetor Tspan18cKO não digerido (sujeito às condições de digestão, mas sem enzima). Tal como esperado, no segundo poço, observa-se apenas um fragmento/banda que deduzimos ter cerca de 15 Kb por estar acima da banda correspondente ao maior peso molecular (12 Kb) do marcador 1Kb+. No terceiro poço é possível observar 2 bandas que correspondem a diferentes formas do plasmídeo não digerido.

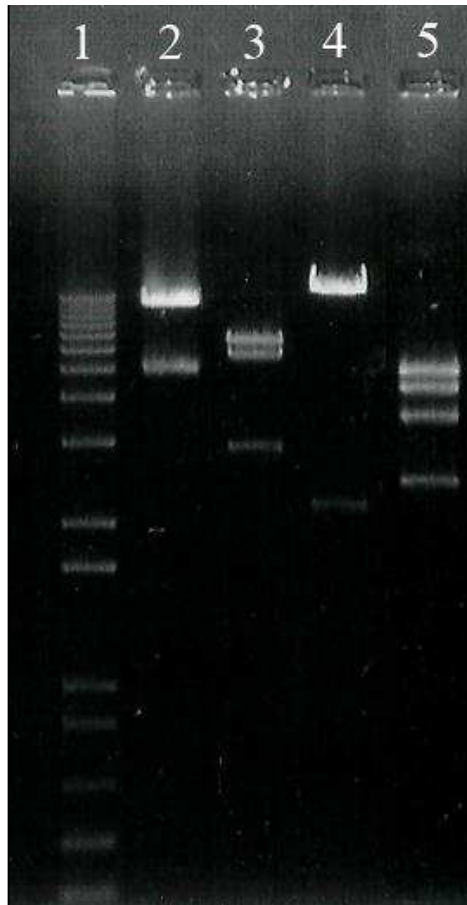
Figura 36 - Linearização do vetor Tsp18cKO. Fotografia de gel de agarose a 0,8% após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1Kb+ DNA ladder (1), do vetor Tsp18cKO linearizado por *NotI* (2) e do vetor Tsp18cKO não digerido (3).



Relativamente às restrições de diagnóstico (veja-se 3.5.1.4), confirmou-se que *SacII* e *XhoI* têm dois locais de reconhecimento, *SpeI* três locais e *BglII* quatro locais no vetor Tspan18cKO, pois após eletroforese em gel de agarose, o produto da digestão do vetor circular aparece como dois, três ou quatro fragmentos/bandas, respetivamente. A figura 37 mostra a imagem de um gel de agarose onde foi carregado, da esquerda para a direita, o produto da digestão de uma amostra de 500 ng de vetor Tspan18cKO circular com *SacII*, *SpeI*, *XhoI* e *BglII*. Tal como esperado, a digestão por *SacII* produziu dois fragmentos, com 10409 pb e 5001 pb; por *XhoI* produziu dois fragmentos com 2157 pb e 13253 pb; por *SpeI* produziu três fragmentos com 6697 pb, 5789 pb e 2924 pb e por *BglII* quatro fragmentos com 2462 pb, 3518 pb, 4371 pb e 5059 pb. Com estas restrições confirmámos também o tamanho total do vetor Tspan18cKO: 15410 pb.

A presença das mutações necessárias introduzir no genoma murino foi avaliada por sequenciação (veja-se 3.5.1.5.). Todas as regiões sequenciadas foram analisadas no programa BLAST® e confirmou-se o alinhamento a 100% com a sequência prevista fornecida juntamente com o vetor Tspan18cKO.

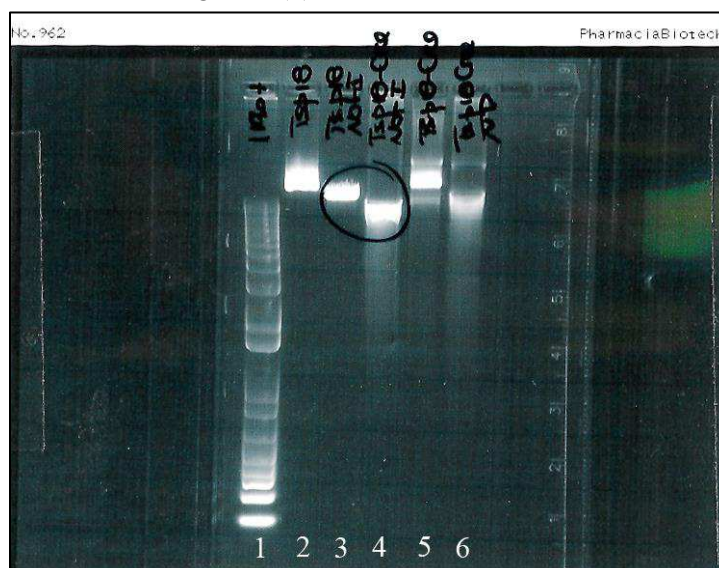
Figura 37 - Restrições de diagnóstico do vetor Tspan18cKO.
Fotografia de gel de agarose a 0,8% após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1Kb+ DNA ladder (1) e do vetor Tsp18cKO digerido por *SacII* (2), *SpeI* (3), *XhoI* (4) e *BglII* (5).



Tendo-se confirmado o perfil de restrição do vetor Tspan18cKO e a presença de todas as mutações necessárias introduzir no genoma murino por sequenciação, procedeu-se à testagem da funcionalidade dos locais *loxP*, tal como descrito em 3.5.1.6. A estirpe de *E. coli* BNN132 expressa a recombinase Cre. Assim, a extração de ADN plasmídico a partir desta estirpe deveria devolver-nos o vetor Tspan18cKO com menos 1995 pb (correspondentes à sequência flanqueada pelos dois primeiros locais *loxP*) ou com menos 1771 pb (correspondentes à sequência flanqueada pelo segundo e pelo terceiro locais *loxP*) ou, alternativamente, com menos 3766 pb (correspondentes à sequência flanqueada pelo primeiro e terceiro locais *loxP*) caso todas as sequências *loxP* se encontrem diretas. Para podermos notar o diferente tamanho molecular destas perdas, o vetor Tspan18cKO extraído das células competentes *E. coli* BNN132 foi linearizado com a enzima *NotI* e procedeu-se à electroforese em gel de agarose.

Figura 38 - Testagem da funcionalidade dos locais *loxP*.

Fotografia de gel de agarose a 0,8% após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1Kb+ DNA ladder (1), do vetor Tspan18cKO extraído de *E. coli* M.O.S (2) do vetor Tspan18cKO extraído de *E. coli* M.O.S e linearizado com *NotI* (3) do vetor Tspan18cKO extraído de *E. coli* BNN132 e linearizado por *NotI* (4); do vetor Tspan18cKO extraído de *E. coli* BNN132 (5) e do vetor Tspan18cKO extraído de *E. coli* BNN132 não digerido (6).



A figura 38 mostra a imagem de um gel de agarose em que, da esquerda para a direita temos o marcador de pesos moleculares (1Kb+ DNA ladder), o vetor Tspan18cKO extraído de células competentes *E. coli* M.O.S, o vetor Tspan18cKO extraído de células competentes *E. coli* M.O.S e linearizado por *NotI*, o vetor Tspan18cKO extraído de células competentes *E. coli* BNN132 e linearizado por *NotI*, o vetor Tspan18cKO extraído de células competentes *E. coli* BNN132 e o vetor Tspan18cKO extraído de células competentes *E. coli* BNN132 que serviu de controlo

à digestão (ao qual se adicionou a mistura de digestão sem a endonuclease de restrição e foi incubado a 37°C durante três horas). Tal como esperado, o vetor Tspan18cKO recombinado migra mais no gel e parece de fato ter menos cerca de 2 a 3 Kb sendo difícil precisar o tamanho molecular exato quando se tratam de fragmentos desta ordem de dimensão.

Feitas as confirmações atrás referidas, procedeu-se à amplificação e extração do ADN plasmídico em grande escala de modo a obtermos uma quantidade suficiente para ainda realizar a linearização e a purificação por fenol-clorofórmio, necessárias para posteriormente introduzirmos o vetor Tspan18cKO por eletroporação nas células estaminais embrionárias.

A tabela 5 resume o resultado de todos os procedimentos de extração e purificação realizados.

Tabela 5 - Amostras de ADN plasmídico do vetor Tsp18cKO. Características das amostras resultantes dos processos de extração em grande escala e do processo purificação após linearização com *NotI*. Vf – volume final; A₂₆₀ – absorvância 260nm; A₂₈₀ – absorvância 280nm.

Amostra	Extração				Digestão <i>NotI</i>	Purificação			
	Vf (µL)	Concentração (µg/mL)	Quantidade (µg)	ratio A ₂₆₀ /A ₂₈₀		Vf (µL)	Concentração (µg/mL)	Quantidade (µg)	ratio A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1	450	655	290	1,55		50	735	36,75	1,88
2	450	846	380	1,48		100	2285	228,5	1,86
3	450	1198	540	1,50		200	1212,5	242,5	1,77
4	320	2022	647	1,87		200	1712,5	352,5	1,85

Verifica-se que o processo de purificação por fenol-clorofórmio acarreta sempre algumas perdas, no entanto, avaliando pelo ratio A₂₆₀/A₂₈₀ nota-se a melhoria da qualidade do ADN plasmídico.

O baixo ratio A₂₆₀/A₂₈₀ do ADN extraído em grande escala pode dever-se a vários fatores. Entre eles, o mais comum será a presença de partículas proteicas em suspensão no ADN plasmídico eluído, uma situação que não afeta a qualidade do ADN plasmídico mas interfere com a leitura da absorvância. A presença de proteínas que não foram eficientemente precipitadas e se mantiveram em solução pode afetar de fato a qualidade do ADN plasmídico. Outra das causas possíveis poderá ser a presença de ADN genómico da estirpe de células competentes transformada consequência de uma agitação demasiado vigorosa do lisado bacteriano. Exceder o tempo de lise recomendado pode também causar este tipo de contaminação. Como o procedimento de purificação com fenol-clorofórmio após a linearização melhorou bastante a qualidade do ADN plasmídico, a avaliar pelo ratio A₂₆₀/A₂₈₀ deduzimos que a principal causa da baixa qualidade inicial foi de fato a contaminação por proteínas.

4.3.2. Eletroporação

Como vimos em 3.5.4, a eletroporação induz a formação temporária de poros nas membranas (bicamadas fosfolipídicas) das células. O material genético extracelular pode assim passar através dos poros temporários formados e ser assimilado pelo ADN das células-alvo. Neste caso o objetivo consistia em fazer entrar nas células estaminais embrionárias ADN plasmídico vetor Tspan18cKO.

Uma vez que a escolha apropriada do tempo do pulso, voltagem e forma da onda elétrica é fundamental para minimizar a perturbação das membranas, promover a melhor viabilidade das células-alvo e alcançar elevada eficiência de transformação, é importante definir os parâmetros ótimos de eletroporação para assegurar que cada CEE é transformada eficientemente. Estes parâmetros incluem a *time constant* e a força de campo aplicada à amostra. A *time constant* depende da resistência total da amostra e da capacitância do pulso elétrico do aparelho de eletroporação; é uma medida da quantidade de tempo que leva a voltagem do pulso elétrico a decrescer para um valor $1/e$ do pico real de voltagem do pulso elétrico, medido em milissegundos. O seu valor ideal situa-se entre 6 e 7, e varia com a concentração de células e quantidade de ADN adicionado. É importante tomar nota deste parâmetro para perceber se a eficiência de eletroporação foi diferente nalguma cuvette. Uma vez que a capacitância do electroporador é constante, a *time constant* dá-nos uma medida da resistência total da amostra, que neste caso é dada pela quantidade de células presentes em suspensão. A *força do campo* depende da voltagem inicial fornecida pelo electroporador e da distância entre os eléctrodos na cuvette.

Foram realizadas três sessões de eletroporação. As tabelas 6, 7 e 8 descrevem as características específicas de cada mistura de eletroporação, a designação das placas para onde o conteúdo de cada cuvette foi transferido e o número de colónias picadas após 8 dias de seleção positiva e 7 dias de seleção negativa. Note-se que para as três sessões de eletroporação as colónias foram picadas apenas no 8º dia de seleção (10º dia após a eletroporação).

No dia seguinte à eletroporação observou-se que cerca de 30% das células estavam mortas, tendo perdido a sua forma característica e encontrando-se em suspensão no meio. Nesse dia mudou-se o meio, para remover células mortas e detritos resultantes (inerente à eletroporação) e para assegurar que o maior número possível de células pudesse recuperar do processo de eletroporação. No segundo dia após a eletroporação começou o processo de seleção tal como descrito em 3.5.4. No terceiro dia adicionou-se o agente de seleção negativa. O meio foi depois mudado diariamente de modo a eliminar as células mortas no processo de seleção, reestabelecer as condições ótimas para o crescimento das células (meio, soro e LIF frescos) e restaurar a quantidade ativa ótima de cada agente de seleção.

Na primeira sessão de eletroporação (Tabela 6) foram usadas diferentes quantidades de ADN plasmídico para perceber qual seria a concentração ótima que nos permitiria obter a melhor relação entre número de cópia de vetor por célula, que se pretende que seja um, e o número de células transfectadas que se pretende que seja o maior possível. Nesta primeira sessão, as células eletroporadas em cada cuvete foram passadas para uma placa de 100 mm. A quantidade de ADN usada não pareceu ter influência no número de colónias picadas. Note-se por exemplo que na cuvete 3 foram usados apenas 13,2 µg de ADN plasmídico e foram picadas 56 colónias da placa 3; por outro lado, na cuvete 7 foram usados 39,6 µg de ADN plasmídico e foram picadas 24 colónias na placa 7. A *time constant* variou entre 8 e 9,8, uma variação aceitável. No global esta sessão de eletroporação permitiu-nos picar 336 colónias.

Tabela 6 - Primeira sessão de eletroporação. Descrição das características específicas de cada mistura de eletroporação e do número total de colónias picadas após seleção positiva e negativa em cada placa.

Cuvete	µg ADN	µL ADN	# CEEs	<i>Time constant</i> (ms)	Placas	Σ colónias picadas
1	13,3	10	$7,9 \times 10^6$	8,8	1	24
2	13,2	10	$7,8 \times 10^6$	9,6	2	24
3	13,2	10	$7,9 \times 10^6$	8,1	3	56
4	26,4	20	$7,8 \times 10^6$	9,6	4	40
5	26,4	20	$7,8 \times 10^6$	8,0	5	64
6	26,4	20	$7,8 \times 10^6$	8,2	6	64
7	39,6	30	$7,75 \times 10^6$	9,4	7	24
8	39,6	30	$7,75 \times 10^6$	9,8	8	40

Assim, para a segunda sessão de eletroporação (Tabela 7) foi decidido usar a quantidade intermédia de ADN plasmídico (aproximadamente 20 µg), que foi aquela que nos tinha permitido obter maior número de colónias picadas por placa (64) na primeira sessão. A quantidade de ADN (21 µg) e de células ($7,8 \times 10^6$) foi a mesma em todas as cudevtes. Nesta sessão a *time constant* foi em média mais baixa (6,8) do que na primeira sessão (8,6), para a mesma quantidade de CEEs usadas em cada mistura. Tal resultado pode dever-se a uma melhoria na técnica de ressuspensão da suspensão celular final levando à existência de menos agregados celulares que possam causar aumento da resistência da amostra. As células de cada cuvete foram passadas para duas ou três placas de 100 mm; esta metodologia, além de nos permitir ter placas controlo – negativo (sem agente de seleção positiva ou negativa (placa A1)), só com seleção positiva (placa E3) e só com seleção negativa (placa E2) – também nos permitiu obter colónias com melhor aspeto, menos diferenciadas, uma vez que a densidade inicial em cada placa era menor. No final da seleção positiva e negativa, picámos um total de 188 colónias,

menos colónias que na sessão anterior, mas colónias menos diferenciadas e com melhor qualidade.

Tabela 7 - Segunda sessão de eletroporação. Descrição das características específicas de cada mistura de eletroporação e do número total de colónias picadas após seleção positiva e negativa em todas as placas semeadas por cada cuvete.

Cuvete	µg ADN	µL ADN	# CEEs	<i>Time constant</i> (ms)	Placas	Σ colónias picadas
1	21	20	$7,8 \times 10^6$	7,5	A1, A2	23
2	21	20	$7,8 \times 10^6$	6,7	C1, C2, C3	40
3	21	20	$7,8 \times 10^6$	6,7	D1, D2	40
4	21	20	$7,8 \times 10^6$	6,5	E1, E2, E3	28
5	21	20	$7,8 \times 10^6$	6,8	B1, B2, B3	57

Na terceira sessão de eletroporação (Tabela 8) foram usadas menos células, mas a mesma quantidade de ADN plasmídico que na segunda sessão. Tal decisão prendeu-se com o fato de termos verificado que uma menor quantidade de células eletroporadas semeadas por placa, conduzia à obtenção de maior número de colónias com bom aspeto e com o tamanho ideal para serem picadas no final da seleção positiva-negativa. Nesta terceira sessão de eletroporação a *time constant* foi em média mais baixa (6,1) do que na segunda sessão, o que se pode dever à menor quantidade de células (e consequentemente menor resistência) usada em cada mistura de eletroporação.

Tabela 8 - Terceira sessão de eletroporação. Descrição das características específicas de cada mistura de eletroporação e do número total de colónias picadas após seleção positiva e negativa em todas as placas semeadas por cada cuvete.

Cuvete	µg ADN	µL ADN	# CEEs	<i>Time constant</i> (ms)	Placas	Σ colónias picadas
1	20	20	$5,5 \times 10^6$	6,1	1A, 1B	24
2	0	0	$5,5 \times 10^6$	5,9	2A, 2B	–
3	21	20	$5,5 \times 10^6$	6,1	3A, 3B	12
4	21	20	$5,5 \times 10^6$	6,1	4A, 4B	15
5	21	20	$5,5 \times 10^6$	6,4	5A, 5B	45

As células da cuvete 2 foram usadas para controlo, ou seja, foram sujeitas a eletroporação, mas não tinham ADN plasmídico na mistura de eletroporação. Na placa 2A fez-se seleção positiva-negativa e na placa 2B não aplicámos qualquer agente de seleção; como esperado, na placa 2A praticamente todas as células morreram demonstrando a eficácia dos nossos agentes de seleção nestas células; na placa 2B desenvolveram-se muitas colónias, o que demonstra que a

eletroporação não tem efeito negativo na viabilidade das células. No total picámos 96 colónias para uma só placa de 96 poços.

Das 336 colónias picadas na primeira sessão de eletroporação apenas foi possível recuperar ADN de 155 (46%). Das 188 colónias picadas na segunda sessão de eletroporação apenas foi possível recuperar ADN de 47 (25%). Das 96 colónias picadas na terceira sessão de eletroporação foi possível recuperar ADN de todos (100%). Tal variabilidade observada no número de clones dos quais conseguimos extrair ADN genómico a partir das placas de 96 poços pode dever-se ao diferente tamanho das colónias seleccionadas para picar. Possivelmente na segunda sessão foram seleccionadas muitas colónias pequenas que não alcançaram confluência suficiente nos poços da placa de 96 poços, no mesmo espaço de tempo. Quanto menor a confluência, menor a quantidade de ADN extraído. Nessa sessão, esperar mais tempo do que as 72 horas possivelmente teria permitido obter ADN de um maior número de clones.

4.3.3. Clones de células estaminais embrionárias recombinantes

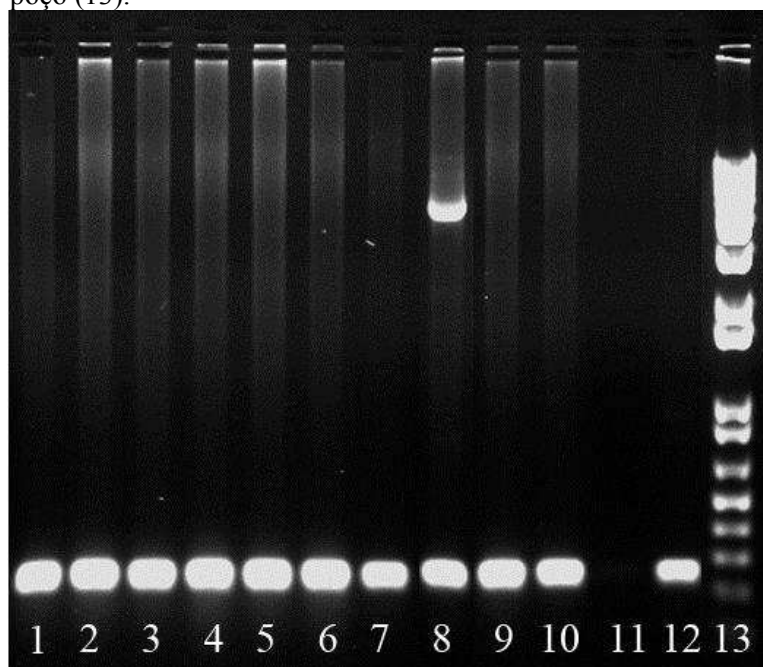
Tal como foi referido em 3.5.6, para seleccionar entre os clones de CEEs resistentes à seleção positiva-negativa aqueles que integraram o vetor Tspan18cKO por recombinação homóloga no local correto do genoma, foram realizadas duas reacções em cadeia da polimerase (PCR).

Primeiro fizemos o rastreio para a ocorrência de recombinação homóloga com o braço direito de homologia do vetor Tspan18cKO. Nesta reacção (PCR Tsp18RA), o fragmento mutante amplificado tem 5141 pb e a banda controlo interno cerca de 230 pb (Figura 18).

A figura 39 mostra a imagem de um gel de agarose ilustrativa dos produtos desse PCR após eletroforese, em que, da esquerda para a direita, foi usado como molde ADN genómico extraído de clones de CEEs não recombinantes (1 a 7, 9 e 10), ADN genómico extraído de um clone de CEEs recombinante (8), água (11), ADN genómico extraído de CEEs R1 não eletroporadas (12) e o marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (13). Nas amostras de ADN genómico das CEEs em que ocorreu recombinação homóloga é possível amplificar os produtos de 5141 pb e de 230 pb, porque a recombinação quando ocorre regra geral ocorre em apenas um dos alelos, ou seja, a quimera é sempre (ou quase sempre) heterozigótica para a mutação. Com este PCR, identificámos no total 7 clones positivos: um da primeira sessão, designado 3.1A (placa 3, poço 1A), três da segunda sessão designados 1.2E, 1.3E e 2.6H, e três da terceira sessão designados 1.11B, 1.11C e 1.12B. Assim, das 620 colónias picadas obtivemos 7 clones positivos. Notou-se assim uma melhoria na eficiência no processo, que pode ter sido devido a um ganho de experiência na manutenção e seleção das CEEs electroporadas.

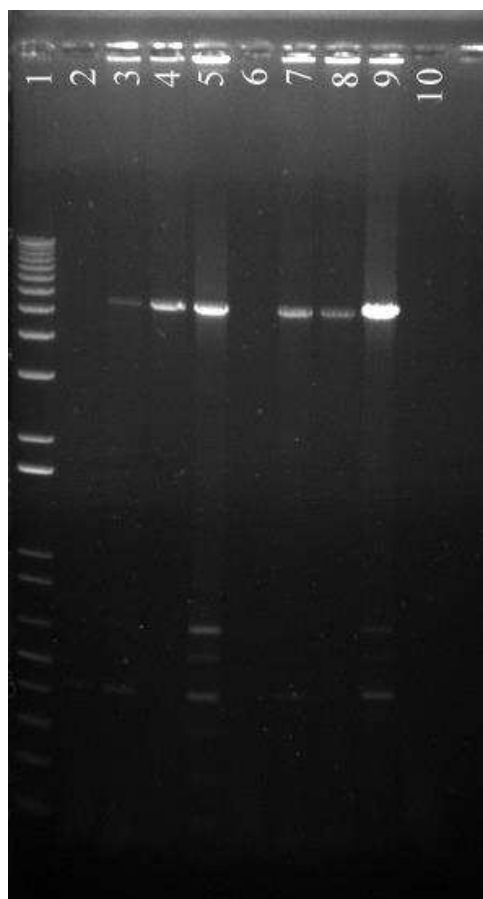
Estes 7 clones foram depois confirmados para a recombinação no braço esquerdo de homologia com um PCR (Tsp18LA) que utiliza apenas dois oligonucleótidos iniciadores, e só tem amplificação no caso dos animais mutantes (veja-se a figura 19 em 3.5.6.).

Figura 39 - PCR Tsp18RA. Fotografia de gel de agarose a 1%, após eletroforese dos produtos da reação usando como ADN molde ADN genómico extraído de clones de CEEs não recombinantes (1 a 7, 9 e 10), ADN genómico extraído de um clone de CEEs recombinante (8), água (11) e ADN genómico extraído de CEEs R1 não eletroporadas (12). O marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder foi carregado no último poço (13).



A figura 40 mostra a imagem de um gel de agarose dos produtos desse PCR após eletroforese, em que, da esquerda para a direita, foi usado como molde ADN genómico dos clones de CEEs 3.1A, 2.6H, 1.3E, 1.2E, 1.11C, 1.11B e 1.12B. O produto de amplificação usando como molde ADN do clone 1.2E não aparece na fotografia deste gel porque não tinha ADN em quantidade suficiente. O mesmo PCR foi repetido usando mais ADN deste clone e foi possível também amplificar o fragmento correspondente à recombinação com o braço esquerdo de homologia. Após o rastreio dos clones por PCR, descongelaram-se as placas de 96 poços respetivas, gémeas das placas de onde se fez a extração de ADN, e colocaram-se os clones positivos a crescer em placas de 4 poços (veja-se 3.5.7.2). Dos sete clones positivos para as duas reações de PCR acima descritas, apenas foi possível recuperar cinco: 3.1A, 1.2E, 1.3E, 1.11C e 1.12B, utilizados nas agregações com os embriões. Os clones 2.6H e 1.11B não se multiplicaram e acabaram por morrer após terem sido descongelados da placa de 96 poços.

Figura 40 - PCR Tsp18LA. Fotografia de gel de agarose a 0,8%, após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (1) e dos produtos da reação usando como ADN molde ADN genômico extraído de clones de CEEs recombinantes (3 a 9), água (10) e ADN genômico extraído de CEEs R1 não eletroporadas (2).



4.3.4. Superovulação e colheita de embriões

Para se obterem embriões cruzaram-se fêmeas superovuladas das estirpes CD-1 e NMRI (veja-se 3.2.3.) com machos reprodutores férteis da mesma estirpe. Os animais da estirpe CD-1 antiga foram usados em oito sessões, os da CD-1 nova em cinco sessões e os da NMRI em dez sessões. Definindo a eficiência da superovulação (Figura 41) como a presença de rolhão vaginal, nas fêmeas induzidas com PMSG e hCG, após cruzamento com o macho solitário fértil, verificou-se que a estirpe NMRI foi a que de fato melhor respondeu à superovulação (72% (8,5%)) apresentando diferenças estatisticamente significativas relativamente à estirpe CD-1 tanto antiga ($p = 0,009$) como nova ($p = 0,00006$).

No entanto nem todas as fêmeas superovuladas e com *plug* ficam gestantes, ou seja, a lavagem dos seus ovidutos não nos permitiu recuperar embriões, apenas alguns oócitos não fertilizados; nestes casos o rolhão vaginal pode resultar de violação, não ocorrendo fertilização. Avaliando a proporção de fêmeas superovuladas que realmente foram fecundadas (Figura 42), as NMRI

foram as que apresentaram maior taxa de gestação (79,8%), no entanto não foi significativamente diferente das CD-1 (64,8% e 73,8%), ou seja, o que determina que uma fêmea fique gestante ou não, não está relacionado com a estirpe.

Figura 41 - Eficiência da superovulação. Média da taxa de sucesso de cada sessão de superovulação. CD-1 antigas: 8 sessões, n = 212; n com plug = 105; NMRI: 10 sessões, n = 172; n com plug = 124; CD-1 novas: 5 sessões, n = 90; n com plug = 42. As colunas representam a média e as barras de erro representam o desvio padrão. * p < 0,05; ** p < 0,001

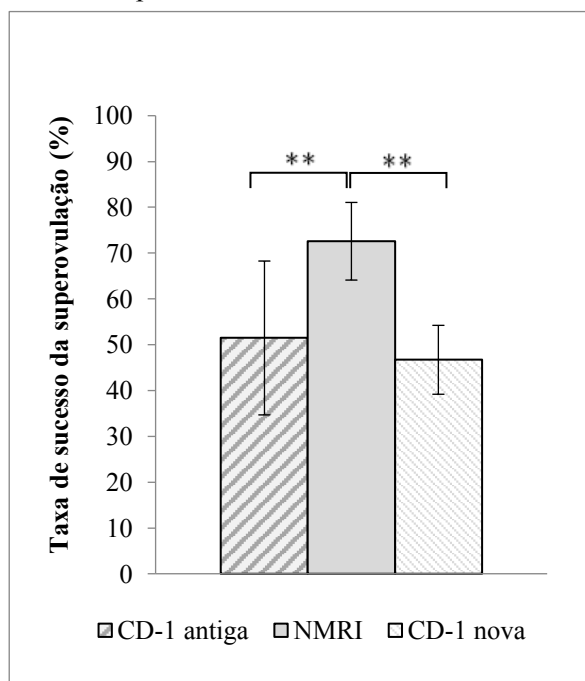
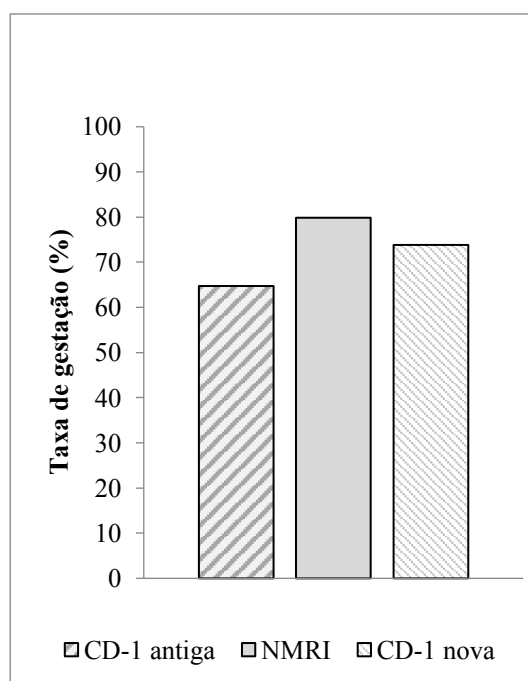
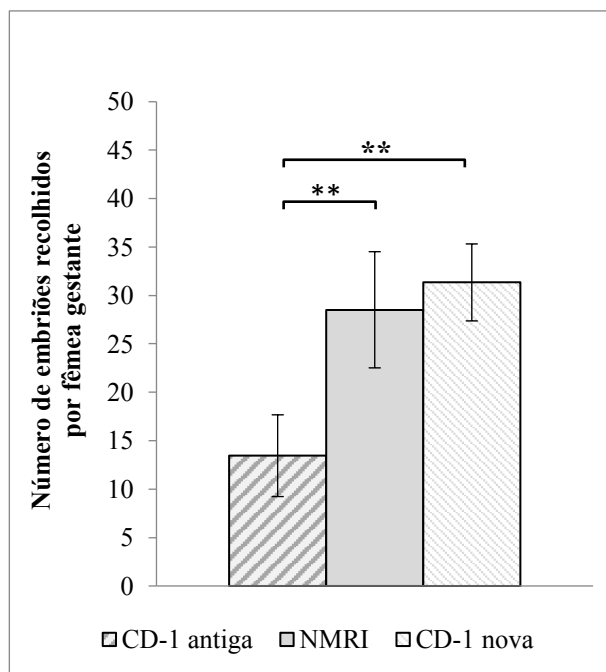


Figura 42 - Taxa de gestação. Proporção de fêmeas superovuladas com *plug* que foram fertilizadas de acordo com a estirpe de murganho usada



Definindo o rendimento de embriões (Figura 43) como a média do número médio de embriões recolhidos por fêmea gestante, para cada estirpe, no conjunto de sessões (foi calculada a média do número de embriões recolhidos por fêmea gestante de cada estirpe usada numa sessão e depois calculámos a média para o conjunto de sessões em que essa estirpe foi usada), verificámos que as fêmeas CD-1 novas foram as que nos proporcionaram melhores colheitas, com uma média de cerca 31 (4) embriões por fêmea, representando um aumento de 2,3× relativamente às fêmeas estirpe CD-1 antiga (13 (4)). As fêmeas NMRI (29 (6)) também tiveram um desempenho significativamente melhor (2,2× mais) que as CD-1 antigas. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as NMRI e as CD-1 novas, indicando que o número médio de embriões obtidos por fêmea não está relacionado com a estirpe de ratinho, mas sim com as condições hígio-sanitárias em que são mantidos, uma vez que as que tiveram melhores desempenho foram aquelas que permaneceram menos tempo e não nasceram no biotério da faculdade.

Figura 43 - Rendimento de embriões por estirpe de murganho. Média do número médio de embriões recolhidos por fêmea, para cada estirpe no conjunto das sessões. CD-1 antigas: 8 sessões, n = 68, total embriões = 911; NMRI: 10 sessões, n = 99; total de embriões = 2908; CD-1 novas: 5 sessões, n = 31, total de embriões = 964. As colunas representam a média e as barras de erro representam o desvio padrão. * p < 0,05; ** p < 0,001



4.3.5. Agregação

Foram realizadas 23 sessões de agregação. Em oito foram usados embriões da estirpe CD-1 antiga, em 10 da estirpe NMRI e em 5 da estirpe CD-1 nova. Ao longo destas sessões foram usados os seguintes clones de CEEs recombinantes: 3.1A, 1.3E, 1.2E, 1.11C e 1.12B. A tabela 9 apresenta a estirpe de embriões e o clone de CEEs agregados em cada sessão.

Em termos temporais, ao longo das 23 sessões de agregação, independentemente da estirpe, verificámos que houve uma tendência linear crescente no que diz respeito ao número de embriões de agregação viáveis (mórulas compactas e blastocistos) obtidos em cada sessão (Figura 44A), o que indica uma melhoria progressiva na qualidade dos embriões recolhidos e também na técnica de lavagem dos ovidutos.

Tabela 9 - Sessões de agregação. Estirpe de embrião recetor e clone de células estaminais embrionárias (CEEs) usados em cada sessão de agregação.

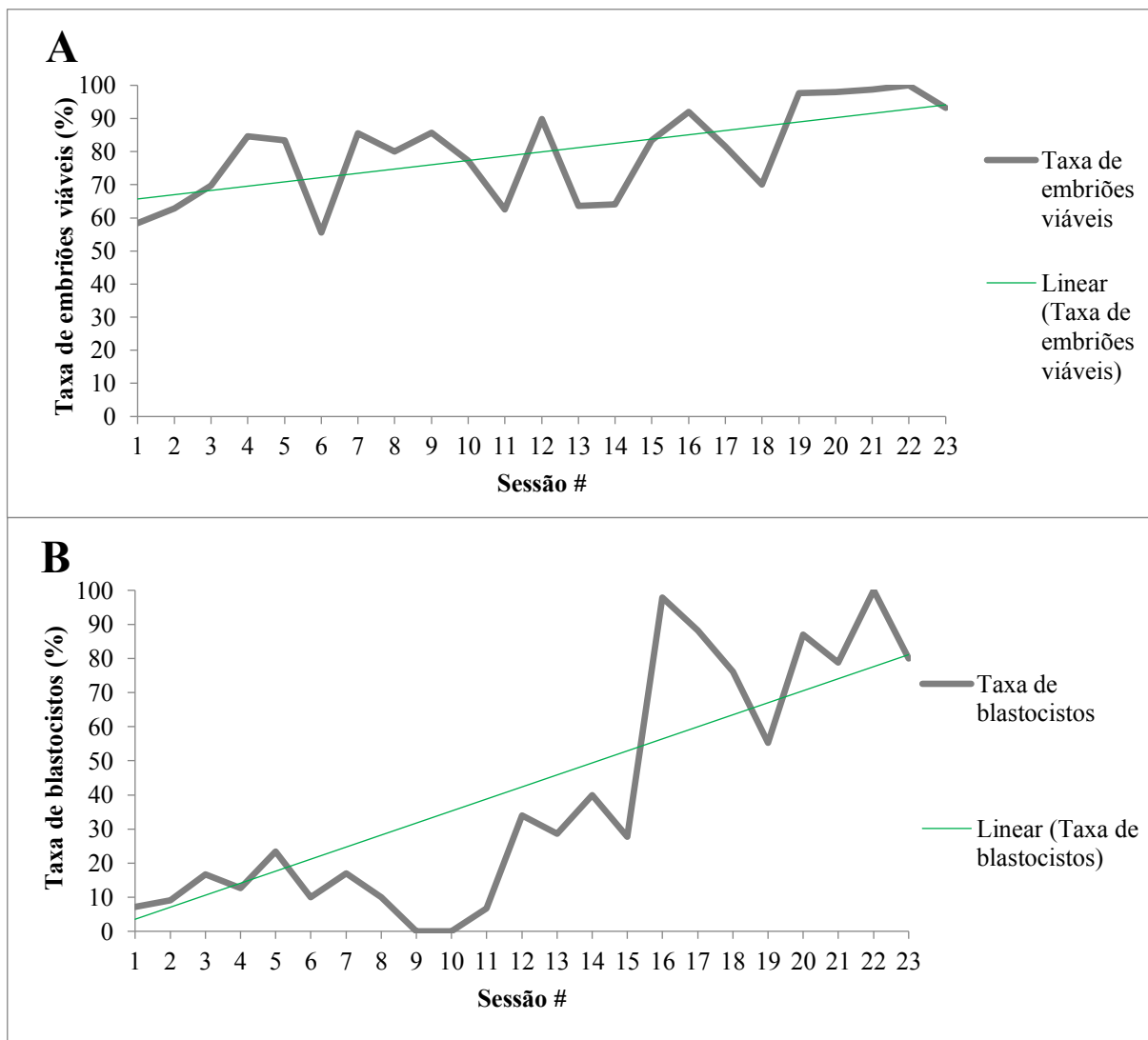
Sessão de agregação #	Estirpe embrião	Clone de CEEs
1	CD-1 antiga	3.1A
2	CD-1 antiga	3.1A
3	CD-1 antiga	1.2E
4	CD-1 antiga	1.2E
5	CD-1 antiga	1.2E
6	CD-1 antiga	1.2E
7	CD-1 antiga	3.1A
8	CD-1 antiga	3.1A
9	NMRI	3.1A
10	NMRI	1.12B
11	NMRI	1.3E
12	NMRI	1.12B
13	NMRI	1.12B
14	NMRI	1.11C
15	NMRI	3.1A
16	NMRI	1.12B
17	NMRI	1.12B
18	NMRI	1.2E
19	CD-1 nova	3.1A
20	CD-1 nova	1.12B
21	CD-1 nova	1.11C
22	CD-1 nova	1.2E
23	CD-1 nova	3.1A

Também em termos temporais, independentemente da estirpe, verificámos que houve uma tendência linear crescente na proporção de blastocistos obtidos (Figura 44B), apesar de até à 15ª sessão ter sido sempre inferior a 40%. Parece assim ter havido uma melhoria significativa a partir da 15ª sessão, com proporções sempre superiores a 50%.

Este resultado pode estar relacionado com a estirpe dadora, uma vez que até à 8ª sessão usámos embriões (2,5 dpc) das fêmeas CD-1 antigas, da 8ª até à 18ª sessão usámos embriões das fêmeas NMRI com resultados bastante variáveis e a partir da 18ª sessão usámos mórulas de fêmeas CD-1 novas com resultados mais consistentes. Outra explicação para esta observação relaciona-se com a perícia do operador não só para seleccionar apenas os embriões mais desenvolvidos, em fase de mórula “pré-compacta”, para colocar na placa de agregação, mas também no tratamento dos embriões com o ácido de Tyrode’s, que foi progressivamente otimizado, minimizando perdas de viabilidade dos embriões.

Apesar da tendência linear crescente no sucesso da agregação, verificou-se grande variabilidade entre sessões, o que poderá estar relacionado com o clone de CEEs usado para agregar.

Figura 44 - Sucesso da agregação ao longo do tempo. (A) Número de embriões viáveis obtidos do total de embriões distribuídos nas placas de agregação. (B) Número de blastocistos obtidos do total de embriões distribuídos nas placas de agregação.

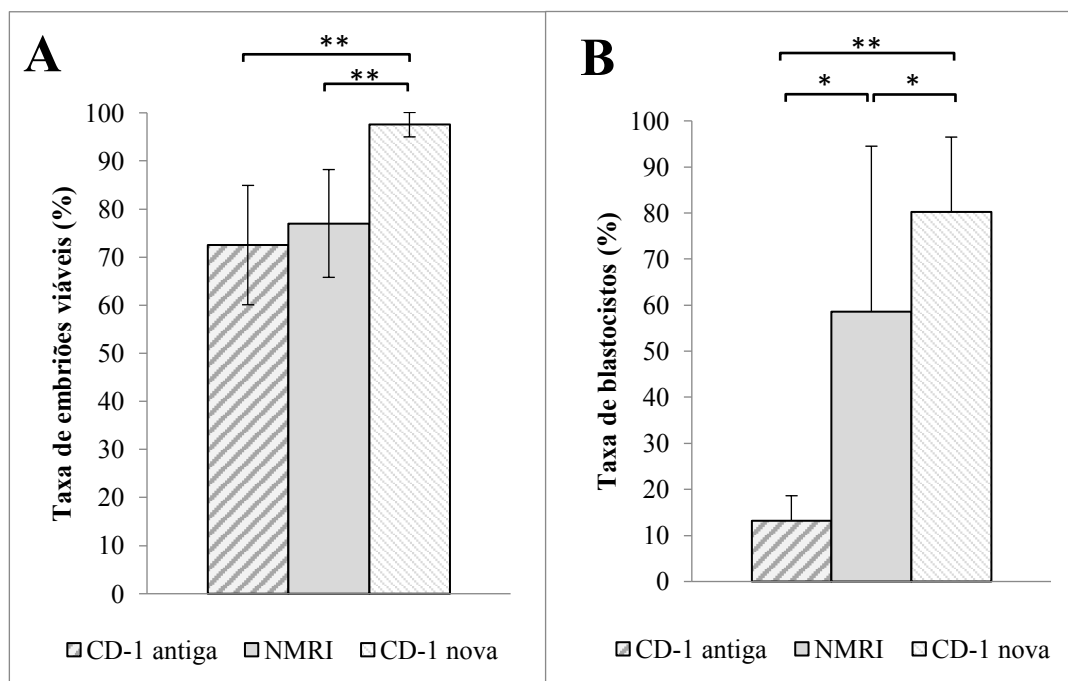


4.3.5.1. Por estirpe dadora de embriões

Uma vez que ao longo das sessões realizadas, o sucesso da agregação parece ter sido influenciado pela estirpe dadora de embriões, decidimos analisar este parâmetro para cada uma das estirpes. Avaliando o sucesso da agregação em termos de embriões viáveis (Figura 45A), ou seja, mórulas compactas e blastocistos resultantes de agregação com células estaminais embrionárias, a estirpe CD-1 nova foi a que nos proporcionou melhores resultados, com 1,3× mais embriões que a estirpe NMRI ($p = 0,0002$) e 1,4× mais embriões que a estirpe CD-1 antiga ($p = 0,0006$), não existindo diferenças estatisticamente significativas entre a estirpe NMRI e CD-1 antiga ($p = 0,43$). Se analisarmos o sucesso da agregação em termos de proporção de blastocistos obtidos (Figura 45B), do total de embriões viáveis, verificamos diferenças ainda mais significativas, com a estirpe CD-1 nova a proporcionar 6× mais blastocistos que a estirpe CD-1 antiga ($p = 0,0005$) e 1,4 × mais do que a estirpe NMRI. Ao contrário do verificado

quando temos em conta todos os embriões viáveis, a estirpe NMRI apresentou diferenças estatisticamente significativas da estirpe CD-1 antiga proporcionando 4,4× mais blastocistos ($p = 0,044$).

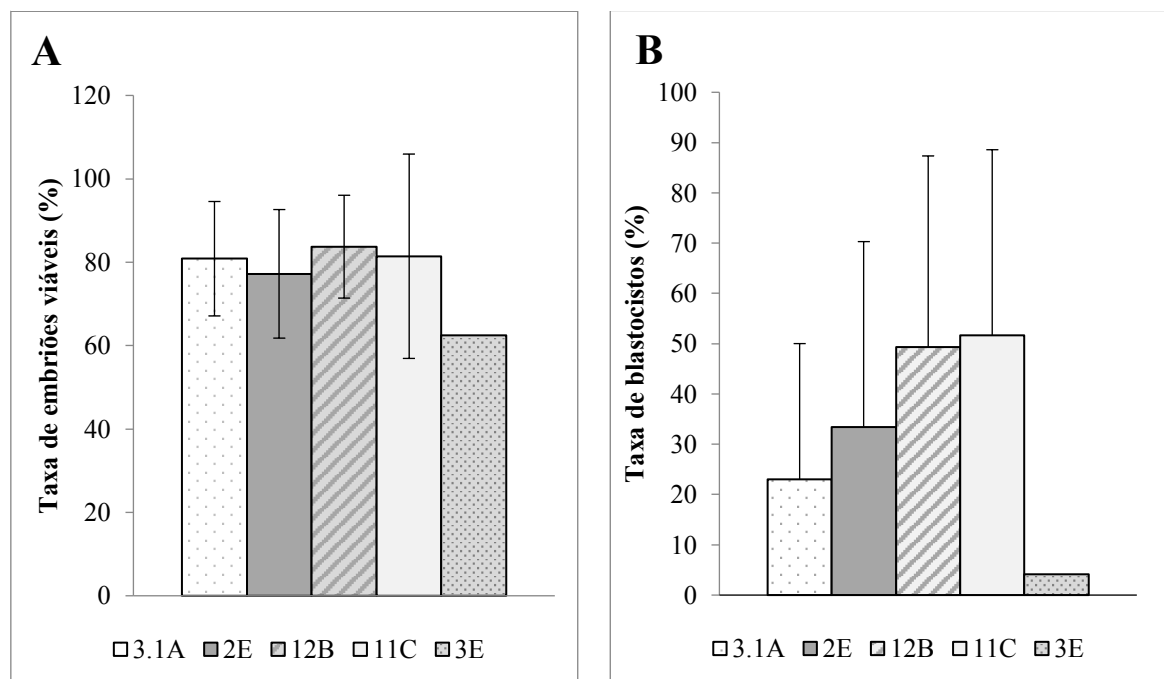
Figura 45 - Sucesso da agregação por estirpe dadora de embriões. (A) Proporção (%) de embriões de agregação viáveis, obtidos relativamente ao total de mórulas na placa. (B) Proporção (%) de blastocistos resultantes da agregação das CEEs com as mórulas, relativamente ao total de mórulas na placa. As colunas representam a média para cada estirpe murganho dadora de mórulas e as barras de erro representam o desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$



4.3.5.2. Por clone de CEEs recombinante

Analisando a agregação por clone de CEEs usado, verificamos que não há diferenças estatisticamente significativas quer em termos de total de embriões viáveis obtidos (Figura 46A), quer em termos de proporção de blastocistos (Figura 46B); note-se que a variabilidade foi sempre muito grande e o número de sessões em que usámos cada um deles também foi diferente, sendo difícil tirar conclusões. No entanto, parece que o clone de CEEs não teve grande influência no sucesso da agregação. Note-se ainda que o clone 1.3E foi usado apenas em uma sessão (11ª) em que obtivemos apenas 10 blastocistos das 240 mórulas que distribuámos pela placa de agregação.

Figura 46 - Sucesso da agregação por clone de CEE recombinante. (A) Proporção (%) média de embriões viáveis, resultantes de agregação, relativamente ao total de mórulas nas placas, analisado por clone de CEEs. (B) Proporção (%) de blastocistos relativamente ao total de embriões viáveis resultantes da agregação das CEEs com as mórulas. As colunas representam a média para cada clone de CEEs usado e as barras de erro representam o desvio padrão. 3.1A, n = 8; 1.2E, n = 6; 1.12B, n = 6; 1.11C, n = 2; 1.3E, n = 1.



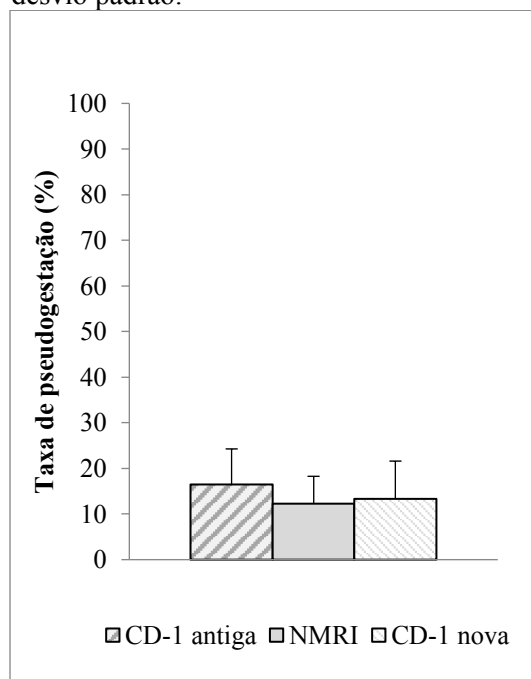
4.3.6. Transferência uterina

Os embriões agregados foram transferidos para o útero de fêmeas pseudogestantes (veja-se 3.5.14 e 3.5.12). Foram usadas fêmeas pseudogestantes das estirpes CD-1 antiga, NMRI e CD-1 nova. Na maioria das sessões de agregação, a estirpe da fêmea recetora foi igual à estirpe da fêmea dadora de embriões, exceto nas sessões 9 e 10 em que foram usadas fêmeas NMRI como dadoras e fêmeas CD-1 antigas como recetoras.

4.3.6.1. Pseugestação

Como foi já referido em 3.5.12, para se obterem fêmeas recetoras, pseudogestantes, colocaram-se, em média 56 (10) fêmeas (com idade superior a 12 semanas e com peso vivo superior a 30 g) com 45 machos vasectomizados, portanto, 1 a 2 fêmeas por macho em cada sessão. Este processo foi semelhante nas 23 sessões de agregação, tendo-se obtido uma média de 9 (4) fêmeas (16,5% (7,8%)) com rolhão vaginal no caso da estirpe CD-1 antiga, 6 (3) fêmeas (12,3% (6%)) da estirpe NMRI e 8 (5) fêmeas (13,3% (8,3%)) da estirpe CD-1 nova (Figura 47).

Figura 47 - Pseudopugs. Proporção (%) média de fêmeas das estirpes CD-1 antiga, NMRI e CD-1 nova com rolhão vaginal após uma noite com um macho vasectomizado. As colunas representam a média para estirpe usada e as barras de erro representam o desvio padrão.



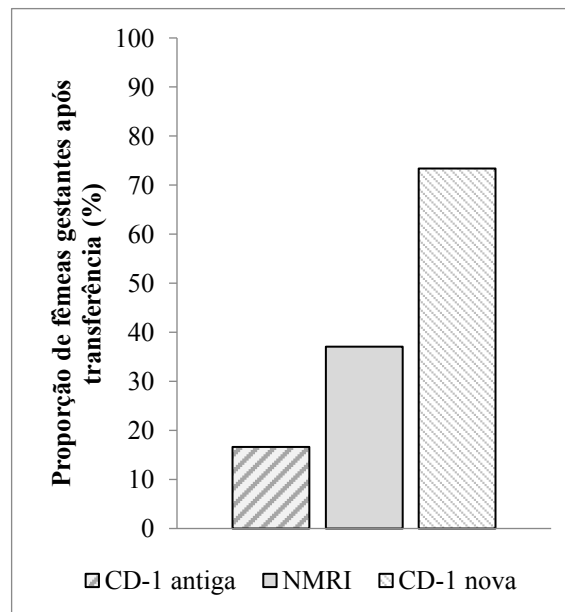
Relativamente a este parâmetro não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre as estirpes usadas. Sendo um parâmetro essencialmente dependente das condições ambientais (alojamento, temperatura, humidade, ciclos de luz, alimentação e bebida) e sanitárias a que os animais estão sujeitos, este resultado é expectável uma vez que as referidas condições foram iguais para todas as estirpes. Outro fator que pode afetar a presença ou ausência de rolhão vaginal é o desempenho dos machos vasectomizados que no presente trabalho foram sempre os mesmos, justificando também a ausência de diferenças estatisticamente significativas.

4.3.6.2. Sucesso por estirpe recetora

Analisando o sucesso das transferências para cada estirpe, ou seja, a proporção de fêmeas que ficaram gestantes de todas as que foram transferidas (Figura 48), verificamos que as melhores fêmeas recetoras foram as da estirpe CD-1 nova, com uma taxa de sucesso de 73,3% (11 em 15 fêmeas ficaram gestantes), representando um aumento de 4,4× relativamente à estirpe CD-1 antiga (5 em 30) e 2× relativamente à estirpe NMRI (10 em 27).

Contudo, a utilização da estirpe CD-1 nova também coincidiu com a alteração da técnica de transferência nas últimas 6 sessões.

Figura 48 - Sucesso das transferências por estirpe recetora. Proporção de fêmeas gestantes relativamente ao total de fêmeas recetoras utilizadas de cada estirpe.



4.3.6.3. Sucesso por técnica

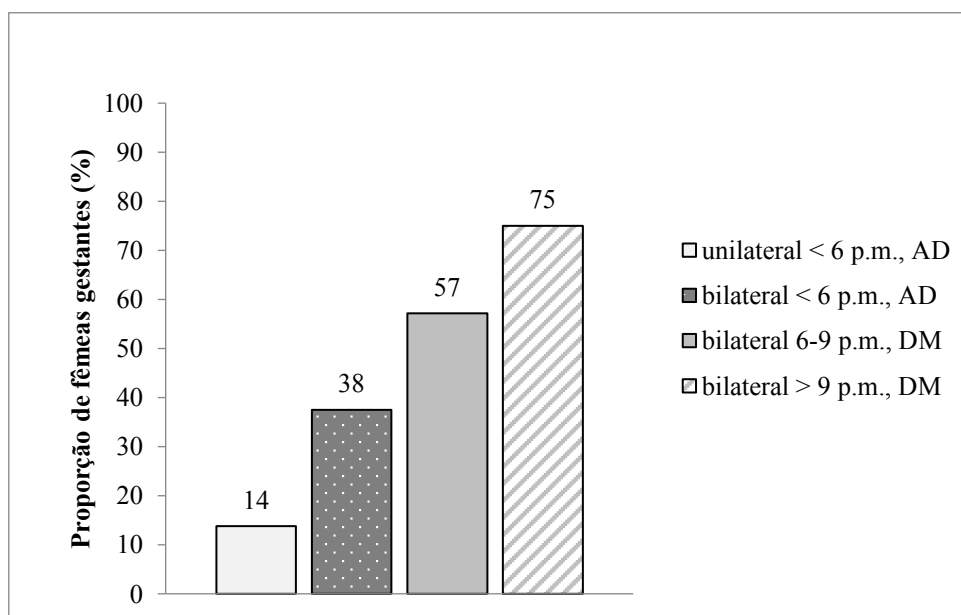
Da 1^a à 8^a sessão e na 12^a e 13^a, as transferências uterinas foram unilaterais (para apenas um dos cornos uterinos) e eram realizadas antes das seis da tarde (6 p.m.), uma altura em que a maior parte dos embriões da placa de agregação ainda não tinha alcançado o estágio de blastocisto. Na 9^a, 10^a, 11^a e da 14^a à 17^a, as transferências uterinas foram bilaterais (para dois cornos uterinos) e também antes das seis da tarde.

Da 18^a à 23^a sessão, as transferências uterinas foram também bilaterais, mas realizadas, entre as 6 da tarde e as 9 da noite (18^a e 19^a) ou já depois das 9 da noite (restantes) e por outro operador (DM).

Assim, nas fêmeas CD-1 antigas e na maior parte das NMRI usadas como recetoras, as transferências foram unilaterais ou bilaterais, mas todas foram realizadas antes das 6 da tarde, altura em que regra geral tínhamos em média 30% de blastocistos na placa de agregação, resultando assim na transferência maioritária de mórulas compactas. Havendo um desfasamento entre o tempo de desenvolvimento do embrião e o tempo de pseudogestação, foram poucas as fêmeas em que houve de fato implantação e uma gravidez evolutiva. No entanto, notou-se uma melhoria quando passámos a transferir para os dois cornos.

Quando mudámos de operador e de altura do dia (e consequentemente de fase de desenvolvimento que a maioria dos embriões na placa de agregação já tinha alcançado), o que também coincidiu com a utilização de fêmeas CD-1 novas como recetoras, aumentámos ainda mais a nossa taxa de sucesso.

Figura 49 - Sucesso das transferências por técnica. Proporção (%) de fêmeas gestantes relativamente ao total de fêmeas recetoras utilizadas. n = número de sessões; unilaterais, < 6 p.m., n = 10; bilaterais, < 6 p.m., n = 7; bilaterais, 6-9 p.m., n = 2; bilaterais > 9 p.m., n = 4. AD e DM – operadores.



Assim, 75% (9 em 12) das fêmeas em que a transferência uterina foi bilateral e realizada depois das 9 da noite (9 p.m.) ficaram gestantes, o que representa uma taxa $5,4\times$ superior à obtida com a transferência unilateral antes das 6 da tarde (6 p.m.) (13,8% ou 4 em 29) (Figura 49). Comparando a transferência unilateral com a bilateral realizadas ambas antes das 6 da tarde, verifica-se que a transferência bilateral teve um sucesso (37,5%) $2,7\times$ superior à transferência unilateral, o que nos permite perceber, que mesmo os embriões não estando na fase ótima de desenvolvimento, transferir para ambos os cornos uterinos aumenta a probabilidade de sucesso (Figura 49). Foi esta observação que nos levou nas sessões seguintes a adotar exclusivamente a técnica bilateral, apesar de na 12ª e 13ª sessão termos feito transferência unilateral por não termos embriões em qualidade e em número suficiente para transferir para os dois cornos. O fato de fazer a transferência bilateral depois das seis da tarde ter aumentado $1,5\times$ a taxa de sucesso (de 37,5% para 57,1%) levou-nos a modificar mais uma vez a técnica e a tentar atrasar ainda mais no dia o momento das transferências, a partir da 19ª sessão, claramente com melhores resultados, com uma taxa de sucesso $1,3\times$ superior (de 57,1% para 75%).

4.3.7. Quimeras

A combinação R1-CD-1 ou R1-NMRI permite a determinação da ocorrência de contribuição das CEEs para a formação do organismo logo no dia de nascimento, pois os olhos escuros (não albinos) são visíveis através das pálpebras fechadas. Uma quimera, por mais fraca que seja a contribuição das CEEs, tem sempre olhos escuros. Assim, foi possível perceber se um animal era quimérico ou não no momento do nascimento, mesmo não tendo sobrevivido.

Analizando o total de crias nascidas de cada estirpe recetora (Tabela 10), verificamos que a estirpe CD-1 nova foi a que proporcionou mais crias (46 no total e destas 35 sobreviveram) e também o maior número de quimeras vivas (das 11 quimeras nascidas, todas sobreviveram).

As fêmeas da estirpe CD-1 antiga apenas nos proporcionaram 9 crias e destas apenas 3 sobreviveram, contudo, nenhuma era quimérica. As fêmeas NMRI permitiram-nos obter mais crias (22) do que a estirpe CD-1 antiga. Das 22 crias “nascidas”, 3 eram quiméricas contudo apenas 1 quimera sobreviveu.

Relativamente à estirpe do embrião usado na agregação, a estirpe NMRI apenas originou três quimeras e a estirpe CD-1 nova as outras 11 quimeras.

Tabela 10 - Número de crias e quimeras obtidas por estirpe recetora nas 23 sessões de transferência uterina.

Estirpe recetora	n.º sessões	Σ crias	Σ quimeras	Σ crias vivas	Σ quimeras vivas
CD-1 antiga	10	9	0	3	0
NMRI	8	22	3	13	1
CD-1 nova	5	46	11	35	11
Totais	23	77	14	51	12

Analizando os resultados independentemente da estirpe recetora, verificamos que das 77 crias nascidas, apenas 14 eram quiméricas (18,2%) e destas apenas 2 não sobreviveram.

Por vezes, as CEEs apenas colonizam a trofoectoderme ou a endoderme primitiva não dando por isso origem a tecidos do embrião próprio, apesar de verificarmos que as CEEs foram agregadas pelo embrião na depressão da placa de agregação.

Relativamente à sobrevivência das crias, note-se que muitas vezes as fêmeas gestantes tinham de ser sacrificadas porque tinham apenas um ou dois fetos, o que é insuficiente para desencadear o parto. Quando alcançavam os 17 dias após a transferência, estas fêmeas eram sacrificadas, os fetos de termo removidos do útero e colocados com mães adotivas (veja-se 3.5.14). Por vezes as mães adotivas rejeitavam estas crias que acabavam por morrer. Outra razão para nem todas as crias sobreviverem (51 de 77) está relacionada com o fato de algumas das fêmeas recetoras conseguirem parir naturalmente 2 a 3 crias, mas acabarem por rejeitar a ninhada nos primeiros

3 dias de vida. As causas para esta rejeição podem incluir inexperiência, uma vez que em algumas sessões de transferência usámos fêmeas nulíparas como recetoras, ou stress ambiental. Analisando os resultados por clone de CEEs usado na agregação (Tabela 11) verificamos que cada um originou entre 13 a 24 crias, exceto o clone 1.3E, que foi usado em apenas uma sessão e originou 1 cria que não sobreviveu. O clone 3.1A, deu origem a 24 crias, destas 17 sobreviveram, contudo, apenas uma era quimérica. No caso do clone 1.2E, das 13 crias que originou, todas sobreviveram, mas tal como para o clone 3.1A, apenas uma era quimérica. O clone 1.12B originou 23 crias e destas 6 eram quiméricas, tal como o clone 1.11C, apesar de este último ter originado menos crias no total (16), o que não deixa de ser um bom resultado uma vez que foi usado em apenas 2 sessões. Todas as 6 crias quiméricas resultantes do clone 1.11C sobreviveram, sendo assim o clone que nos proporcionou mais quimeras vivas.

Tabela 11 - Número de crias e quimeras obtidas por clone de CEEs nas 23 sessões de transferência uterina.

Clone CEEs	n.º sessões	Σ crias	Σ quimeras	Σ crias vivas	Σ quimeras vivas
3.1A	8	24	1	17	1
1.2E	6	13	1	13	1
1.12B	6	23	6	11	4
1.11C	2	16	6	10	6
1.3E	1	1	0	0	0
Totais	23	77	14	51	12

4.3.7.1. Grau de quimerismo por avaliação da coloração da pelagem

Das 12 quimeras que sobreviveram até ao primeiro mês de idade (Tabela 12), 7 eram machos e 5 eram fêmeas, tendo-se verificado assim a tendência para o género masculino, apesar de ser menos acentuada do que o esperado. As 12 quimeras apresentaram graus variáveis de quimerismo (Tabela 12). Numa quimera, a percentagem do corpo que estiver coberta por pelagem *agouti* reflete geralmente a percentagem de contribuição da linha R1 para esse organismo. Esta percentagem foi avaliada de forma subjetiva, tal como descrito em 3.5.15.

Tabela 12 - Quimeras vivas. Identificação (#), sessão de agregação/transferência em que foram obtidas, sexo feminino (F) ou masculino (M), clone de CEEs e estirpe de embrião dador que lhe deram origem, grau de quimerismo (medida subjetiva da percentagem de folículos pilosos que descendem da linhagem do clone de CEEs usado na agregação) e capacidade de transmissão da mutação à descendência.

#	Sessão #	Sexo	Clone CEEs	Estirpe embrião	Grau de quimerismo	Transmissão à descendência
1	18	F	1.2E	NMRI	5 - 10%	Não
2	20	M	1.12B	CD-1 nova	20 - 30%	Não
3	20	M	1.12B	CD-1 nova	20 - 30%	Não
4	20	F	1.12B	CD-1 nova	5 - 10%	Não
5	20	F	1.12B	CD-1 nova	< 5%	Não
6	19	M	3.1A	CD-1 nova	5 - 10%	Não
7	21	M	1.11C	CD-1 nova	20 - 30%	Não
8	21	M	1.11C	CD-1 nova	80 - 90%	Sim
9	21	M	1.11C	CD-1 nova	70 - 80%	Sim
10	21	F	1.11C	CD-1 nova	50 - 60%	?
11	21	M	1.11C	CD-1 nova	40 - 50%	Não
12	21	F	1.11C	CD-1 nova	40 - 50%	Sim

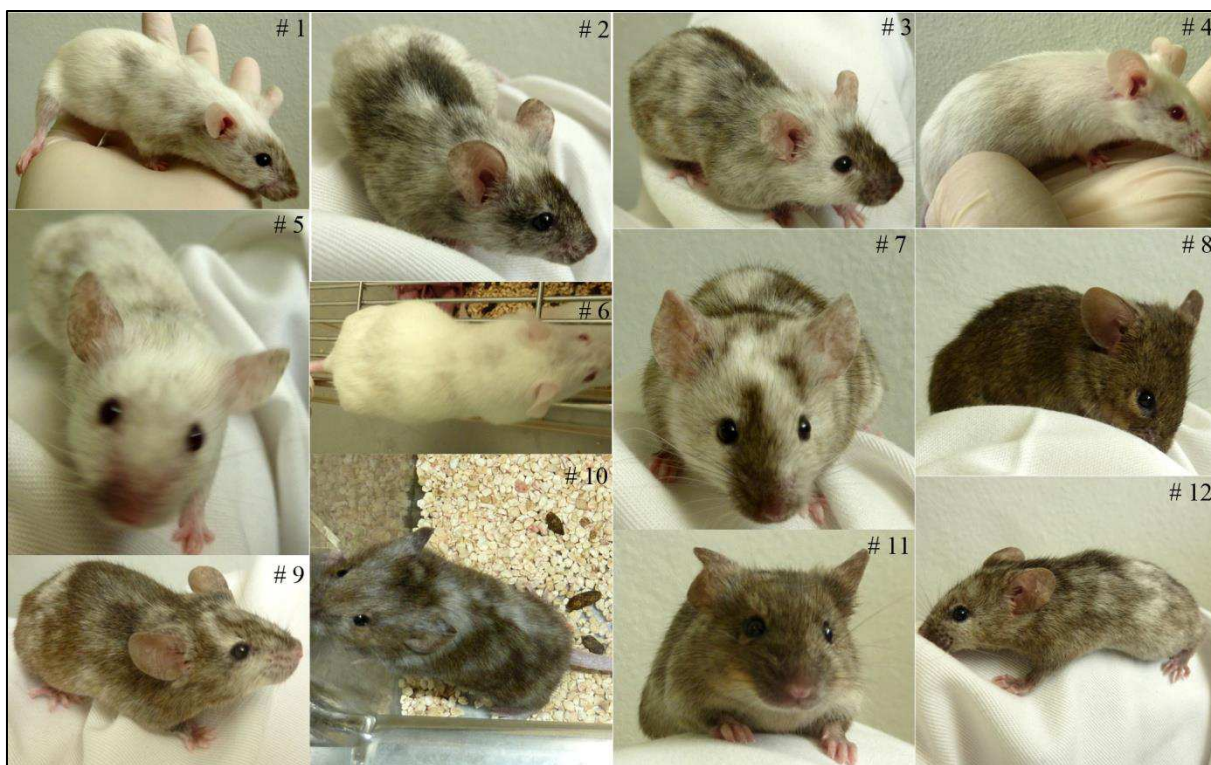
Assim, verifica-se que das 23 sessões de agregação/transferência, apenas 4 (as sessões 18, 19, 20 e 21) nos proporcionaram animais quiméricos que sobreviveram.

Relativamente ao grau de quimerismo, os clones 1.2E e 3.1A originaram quimeras fracas, com apenas 5-10% de contribuição na pelagem; o primeiro originou uma fêmea e o segundo um macho. No caso do clone 1.12B, o grau de contribuição foi bastante variável (entre inferior a 5% até 30%) e originou duas quimeras fêmeas e duas quimeras macho. O clone 1.11C foi o que originou mais quimeras vivas (6, entre elas 4 machos e 2 fêmeas) e com maior grau de contribuição na pelagem; as quimeras 9, 10, 11 e 12 eram quimeras muito fortes, com contribuições a variar entre 40 e 80%; a quimera 8 apresentava a pelagem praticamente *agouti* na sua totalidade com muito poucos pelos brancos e a quimera 7 foi, entre todas as quimeras do clone 1.11C, a mais fraca com apenas 20-30% de contribuição.

A figura 50 apresenta fotografias das 12 quimeras, com cerca de 8 semanas de idade (exceto a quimera 10) altura em que foram juntas com animais do sexo oposto da estirpe CD-1 para verificar se tinham ou não capacidade de transmissão da mutação introduzida à descendência, ou seja, se as CEEs tinham ou não contribuído para as células da linha germinativa.

A quimera 10 morreu às 4 semanas de idade, não tendo por isso sido possível avaliar se tinha ou não capacidade de transmissão da mutação à descendência.

Figura 50 - Fotografias das doze quimeras obtidas. Note-se os diferentes graus de contribuição das células estaminais embrionárias (*agouti*) na pelagem. #: número de identificação



4.3.7.2. Contribuição para as células da linha germinativa

Uma percentagem de quimerismo da pelagem superior a 10-15%, é um indicador da provável percentagem de contribuição das CEEs para todo o organismo (Papaioannou & Johnson, 2000). Contudo, para que a mutação introduzida se estabeleça numa nova população (ou linha) de murganhos, é necessário que as células da linha germinativa estejam entre os tecidos nos quais houve contribuição das CEEs recombinantes.

Para determinar se as quimeras obtidas tinham ou não esta contribuição, realizou-se o seu cruzamento com animais do sexo oposto da estirpe CD-1, tal como descrito em 3.5.15.

O fato de uma quimera dar origem a crias (geração F1) com pelagem *agouti* neste primeiro cruzamento, indica que esta tem contribuição das CEEs na linha germinal.

De todas as quimeras, apenas três, a # 8, # 9 e # 12 tiveram descendentes *agouti* deste primeiro cruzamento (Tabela 12). As quimeras # 8 e # 9, machos, revelaram ter uma contribuição das CEEs a toda a linha germinal, uma vez que todas as suas ninhadas foram integralmente compostas por animais com pelagem *agouti*. A quimera # 12, uma fêmea, teve na primeira ninhada 10 descendentes, dos quais apenas 3 eram *agouti*, e na segunda ninhada dos 8 descendentes apenas 2 eram *agouti*, sendo as restantes crias, de ambas as ninhadas, albinas. A quimera # 9 foi a que originou ninhadas *agouti* maiores, com 14 crias na primeira e 12 crias na

segunda. A quimera # 11, um macho irmão da quimera # 10, com um grau de quimerismo semelhante, originou duas ninhadas mas todos os descendentes foram albinos.

As restantes quimeras, com menor grau de quimerismo (Tabela 12), eram todas férteis, com um número de crias por ninhada regular (8 a 12) contudo não originaram descendência com pelagem *agouti*.

As três quimeras em que houve contribuição das CEEs para as células da linha germinativa resultaram da agregação do clone 1.11C com embriões CD-1 novos. Mais nenhum clone de CEEs originou quimeras com transmissão da mutação à descendência.

Todas as crias foram marcadas (numeradas) e amputou-se a extremidade da cauda para extrair ADN (veja-se 3.6.1).

4.3.8. Genotipagem

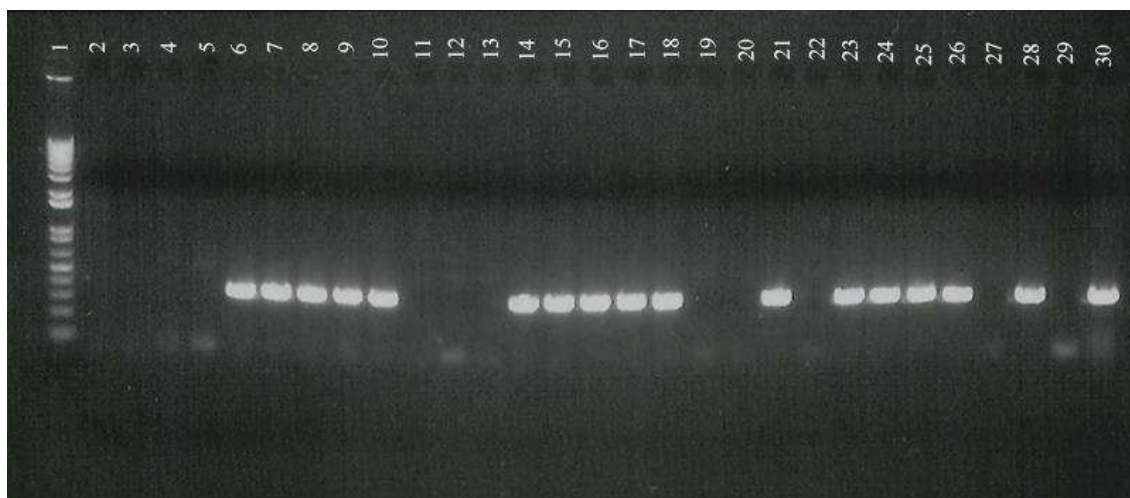
As crias *agouti* (F1) têm 50% de hipóteses de serem heterozigóticas para a alteração (ou alterações) genética introduzida nas CEEs. A probabilidade de 50% deriva do fato de na meiose se originarem gametas haplóides e este fato em conjunção com a elevada probabilidade de ocorrer só um evento integrativo por célula, faz com que só metade dos gametas tenha o complemento cromossómico que inclui a alteração.

4.3.8.1. Dos descendentes F1

A reação de PCR descrita em 3.5.17., com as sequências iniciadoras (Tsp18FWNeoV5 e Tsp18REVNeoV5) que hibridam na cassette de seleção positiva (*Neo*), permitiu-nos fazer o rastreio da presença de um alelo recombinante nos descendentes F1 (animais *agouti* resultantes do cruzamento entre as quimeras e animais da linha CD-1).

A presença do produto desta reação, com 360 pb, foi avaliada após eletroforese em gel de agarose a 1% (realizada tal como descrito em 3.6.2) (Figura 51).

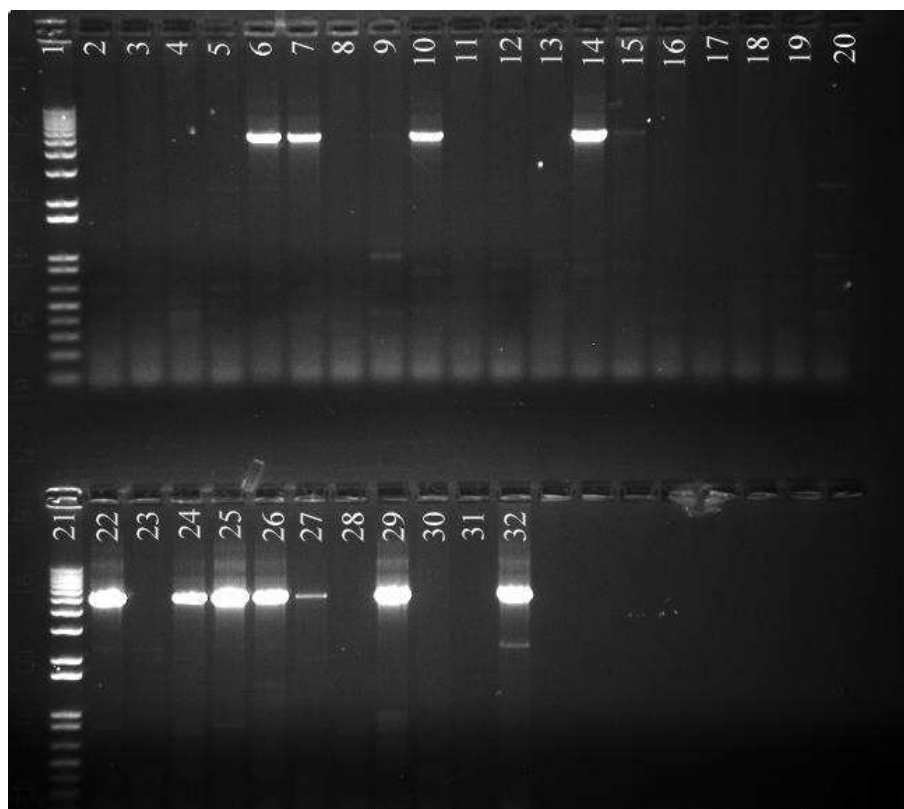
Figura 51 - Genotipagem dos descendentes F1. Fotografia de gel de agarose a 1%, após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (1) e do produto da reação em cadeia da polimerase Tsp18Neo usando como molde ADN genómico extraído de um animal F1 albino (2); ADN genómico extraído de animais F1 *agouti* mutantes (6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 23, 24, 25, 26, 28), onde é possível observar uma banda correspondente a 360 pb; ADN genómico extraído de animais F1 *agouti* não-mutantes (3, 4, 5, 11, 12, 13, 19, 20, 22, 27); água (29) que serviu como controlo negativo da reação, e ADN genómico extraído do clone de CEEs recombinante 1.11C (30) que serviu como controlo positivo.



O resultado desta reação em cadeia da polimerase, revelou a presença do gene *NeoR* no ADN de 52,2 % (12/23) das crias da quimera # 8, em 45% (9/20) das crias da quimera # 9 e em 36,4% (8/22) das crias da quimera # 12, seguindo a distribuição mendeliana esperada.

O ADN extraído da cauda destes animais F1 *agouti* foi ainda usado como molde na reação de PCR (Tsp18RA) descrita em 3.5.6, usando apenas os oligonucleótidos iniciadores Tsp18RAFWNeoV5 e Tsp18RAREVoHA (que nos permitem obter um fragmento com 5141 pb no caso de existir o alelo mutante resultante da recombinação homóloga como vetor Tsp18cKO), para confirmar a recombinação homóloga no local correto (Figura 52). Apenas os animais considerados positivos para as duas reações foram usados para os cruzamentos seguintes.

Figura 52 - Genotipagem de confirmação dos descendentes F1. Fotografia de gel de agarose a 1%, após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (1 e 21) e do produto da reação em cadeia da polimerase Tsp18RA apenas com os oligonucleótidos iniciadores Tsp18RAFWNeoV5 e Tsp18RAREVoHA, usando como molde ADN genômico extraído de animais F1 albinos (2 e 30); ADN genômico extraído de animais F1 *agouti* mutantes (6, 7, 10, 14, 22, 24, 25, 26, 27, 29), onde é possível observar uma banda correspondente a 5141pb; ADN genômico extraído de animais F1 *agouti* não-mutantes (3, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 28, 30), água (31) que serviu como controlo negativo da reação, e ADN genômico extraído do clone de CEEs recombinante 1.11C (32) que serviu como controlo positivo

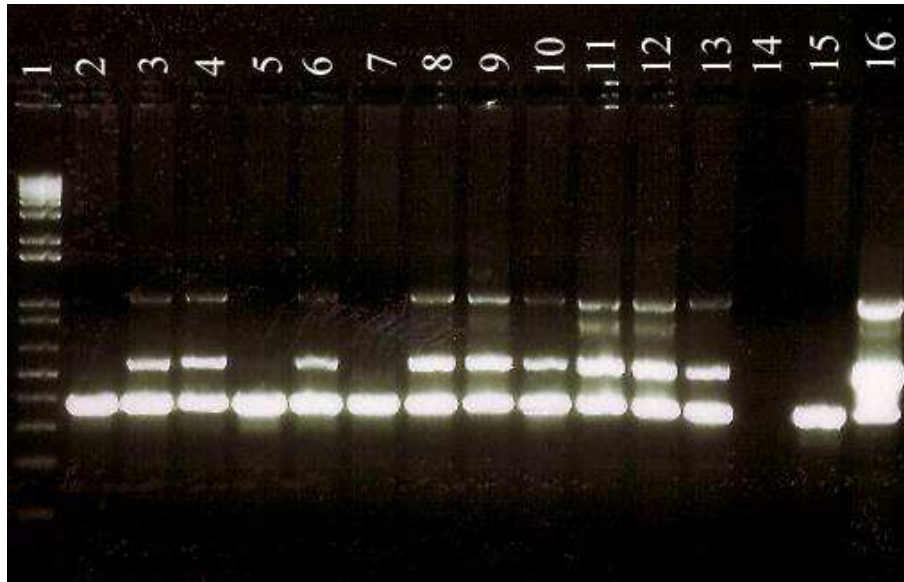


4.3.8.2. Dos descendentes F2

Os descendentes F1 *agouti* em que se confirmou a presença do gene *NeoR* (uma das alterações a introduzir por recombinação homóloga) e a existência dessa mutação no local correto do genoma por recombinação homóloga com o vetor Tspan18cKO, foram cruzados entre si e com animais das linhas *VE-cadherin-Cre-ER^{T2}* e *CAGG-Cre-ERTM* tal como descrito em 3.5.18.

A reação de PCR (Tsp18F2) descrita em 3.5.18.1, com três oligonucleótidos iniciadores em simultâneo (Tsp18FW2, Tsp18REVWT2, Tsp18REVNeo2) permite a amplificação de um produto com 374 pb (alelo *WT*) em todos os animais, servindo assim de controlo da reação, e de um produto com 567 pb (alelo mutante) apenas nos animais Tsp18^{lox/wt} e Tsp18^{lox/lox}. Os produtos da reação foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 53).

Figura 53 - Genotipagem dos descendentes F2 para Tsp18^{lox}. Fotografia de gel de agarose a 2%, após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (1) e dos produtos da reação em cadeia da polimerase (Tsp18F2) usando como molde: ADN genômico extraído de animais F2 Tsp18^{wt/wt} (2, 5 e 7) onde apenas é possível observar a banda correspondente ao alelo *WT* com 374 pb; ADN genômico extraído de animais F2 Tsp18^{lox/wt} (3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13), onde é possível observar uma banda correspondente ao alelo *WT* com 374 pb e uma banda correspondente ao alelo mutante com 567 pb; água (14); ADN genômico extraído de uma animal *WT*, que serviu como controlo negativo da reação, e ADN genômico extraído do clone de CEEs recombinante 1.11C (16) que serviu como controlo positivo.



Esta reação de PCR foi bastante difícil de otimizar e amplificava sempre produtos inespecíficos nos animais heterozigóticos. A partir de determinada altura, apesar de se terem mantido as condições, a reação deixou de funcionar. Esta reação tinha ainda a limitação de não permitir a distinção entre animais homozigóticos (Tsp18^{lox/lox}) e heterozigóticos (Tsp18^{lox/wt}). Contudo, permitiu-nos fazer um primeiro rastreio dos animais F2 resultantes dos cruzamentos entre descendentes F1 e entre estes e as duas linhas descritas acima.

A reação de PCR (VECad-Cre) descrita em 3.5.18.1, com dois oligonucleótidos iniciadores (Cre3 e Cre6) permite a amplificação de um produto com 350 pb, correspondente a uma parte do gene *Cre*. Esta reação foi feita apenas para as amostras de ADN genômico dos animais F2 Tsp18^{lox/wt} de acordo com a reação de PCR anterior (Tsp18F2). O produto destas reações foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 54).

A reação de PCR (CAG-Cre) descrita em 3.5.18.1, com dois oligonucleótidos iniciadores (CAGCre1 e CAGCre2) permite a amplificação de um produto com 100 pb, correspondente a uma parte do gene *Cre*. Esta reação foi feita apenas para as amostras de ADN genômico dos animais F2 Tsp18^{lox/wt} de acordo com a reação de PCR anterior (Tsp18F2). O produto destas reações foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 55).

Figura 54 - Genotipagem dos descendentes F2 Tsp18^{lox/wt} para *VE-Cad-Cre*. Fotografia de gel de agarose a 1%, após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (1) e dos produtos da reação em cadeia da polimerase com os oligonucleótidos iniciadores Cre3 e Cre6, usando como molde: ADN genómico extraído de animais F2 Tsp18^{lox/wt}-*VE-Cad-Cre* positivos (4, 8, 9, 10, 13, 15, 22) onde é possível observar uma banda com 350 pb; ADN genómico extraído de animais F2 Tsp18^{lox/wt}-*VE-Cad-Cre* negativos (2, 3, 5 a 7, 11, 12, 14, 16 a 21, 23 a 26) onde não é possível observar qualquer banda; água (27) e ADN genómico de um animal previamente confirmado como sendo *VE-Cad-Cre* positivo (28) que serve como controlo positivo da reação.

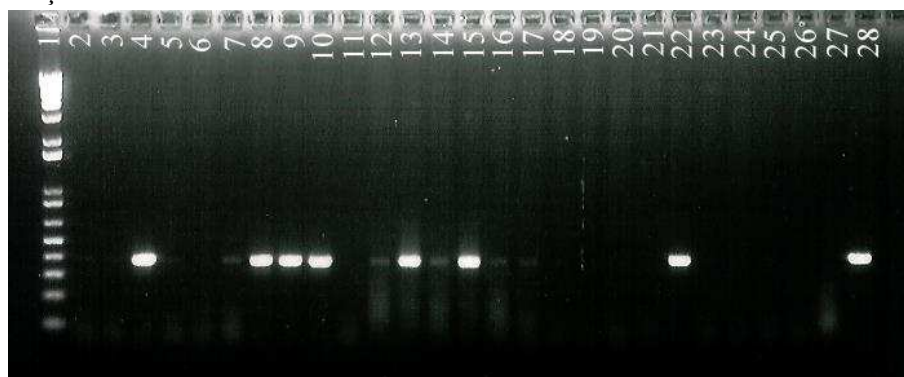
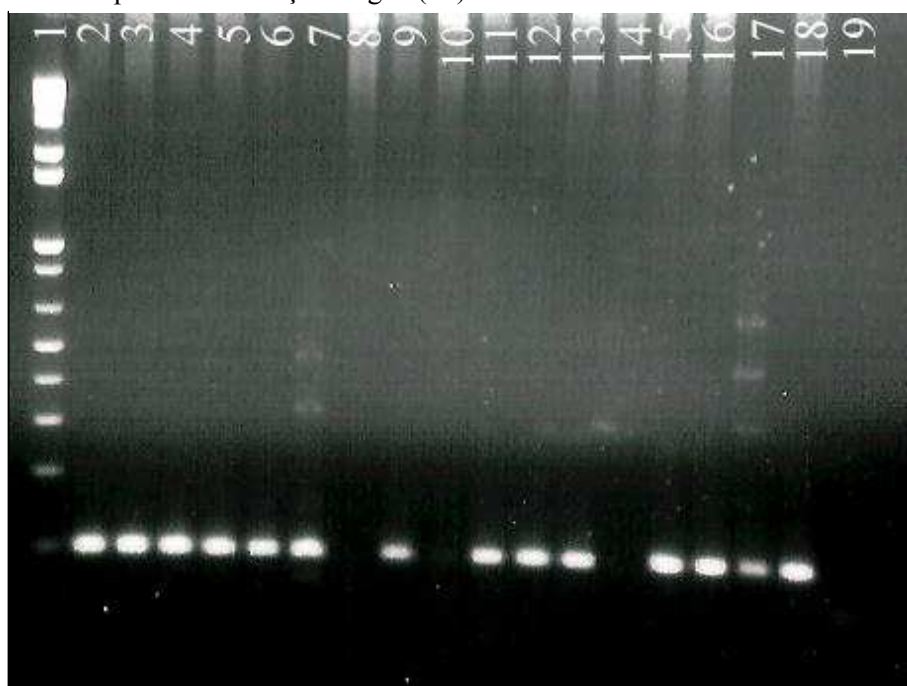


Figura 55 - Genotipagem dos descendentes F2 Tsp18^{lox/wt} para *CAG-Cre*. Fotografia de gel de agarose a 1%, após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (1) e dos produtos da reação em cadeia da polimerase CAG-Cre usando como molde: ADN genómico extraído de animais F2 Tsp18^{lox/wt}-*CAGG-Cre* positivos (2 a 7, 9, 11, 12, 13, 15 e 16)) onde é possível observar uma banda com 100 pb; ADN genómico extraído de animais F2 Tsp18^{lox/wt}-*CAGG-Cre* negativos (8, 10, 14) onde não é possível observar qualquer banda; ADN genómico de animais previamente confirmados como sendo *CAGG-Cre* positivos (17 e 18) que servem como controlo positivo da reação e água (19).

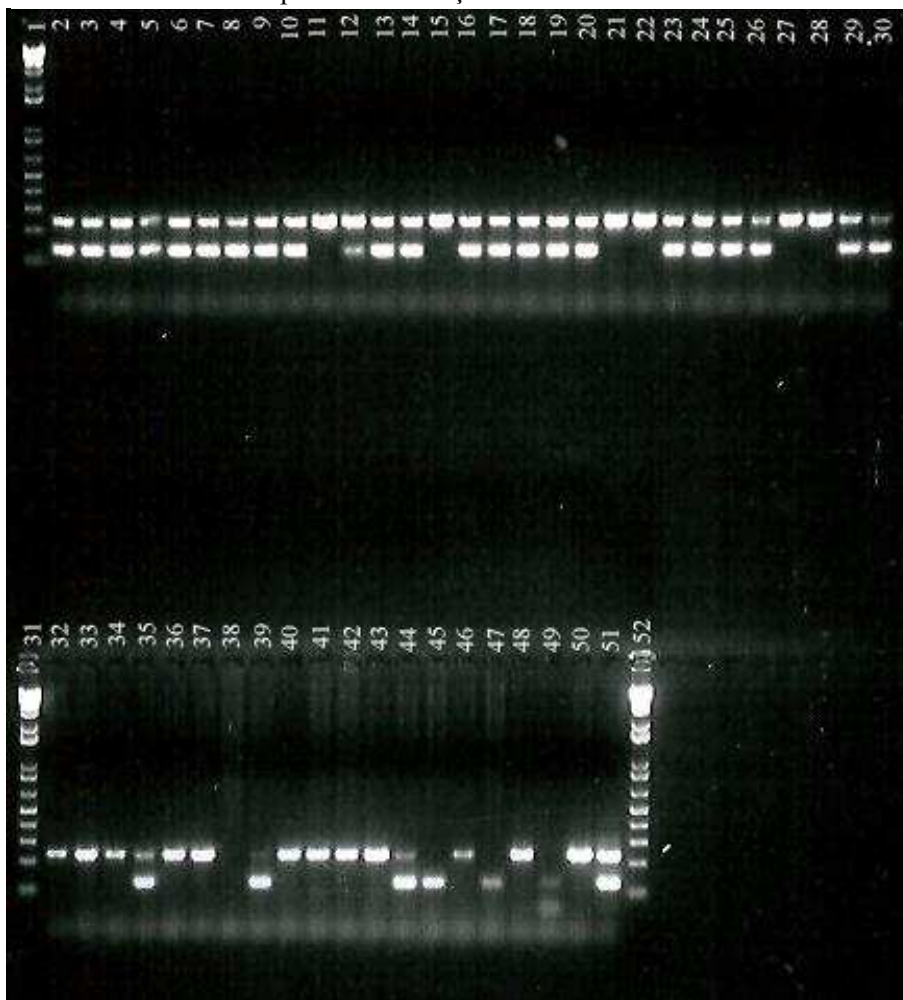


4.3.8.3. Dos descendentes F3

Uma vez que a reação de PCR usada na genotipagem dos descendentes F2 (Tsp18F2) não nos permitia distinguir entre animais homo e heterozigóticos, nesta fase foi necessário desenhar uma outra reação que o permitisse (veja-se 3.5.19.1.). Assim, realizou-se uma primeira reação de PCR (Tsp18HOMO) com três sequências iniciadoras (Tsp18loxFW, Tsp18RevNeo2, Tsp18RevKO2).

Figura 56 - Genotipagem dos descendentes F3 com o PCR Tsp18HOMO.

Fotografia de gel de agarose a 2%, após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (1, 31 e 52) e dos produtos da reação em cadeia da polimerase Tsp18HOMO, que permite a amplificação de fragmentos com 240 e 130 pb correspondentes aos alelos mutante e *WT*, respetivamente, usando como molde: ADN genómico extraído de animais F3 Tsp18^{lox/wt} (2 a 10, 12, 13, 14, 16 a 20, 23 a 26, 29, 30, 35, 44) onde é possível observar as duas bandas; ADN genómico extraído de animais F3 Tsp18^{lox/lox} (11, 15, 21, 22, 27, 28, 32, 33, 34, 36, 37, 40 a 43, 46 e 48) onde é possível observar apenas a banda correspondente ao alelo mutante; ADN genómico extraído de animais F3 Tsp18^{wt/wt} (39, 45 e 47) onde é possível observar apenas a banda correspondente ao alelo *WT*; água (49) e ADN genómico extraído de animais previamente confirmados como sendo Tsp18^{lox/lox} (50) e Tsp18^{lox/wt} (51) que servem como controlo positivo da reação.

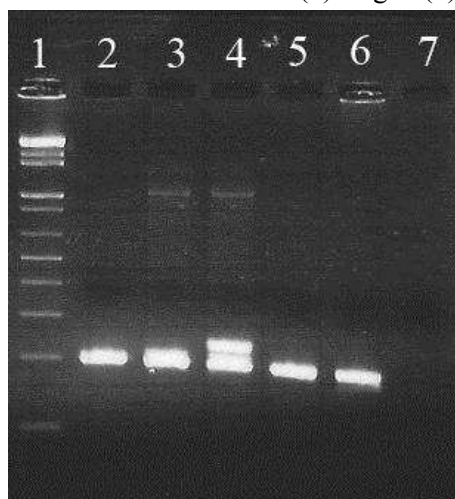


Esta foi uma reação difícil de otimizar pois além de usar três oligonucleótidos iniciadores, tinham de ser dadas condições limitantes para que não ocorresse também amplificação do fragmento delimitado pelos *primers* Tsp18loxFW e Tsp18RevKO2 no alelo mutante (Tsp18^{lox}). Nesta reação, o ADN de animais Tsp18^{lox/wt} (heterozigóticos) permite a amplificação de dois fragmentos, com 130 pb (alelo *WT*) e 240 pb (alelo mutante). O ADN de animais Tsp18^{lox/lox} (homozigóticos) apenas permite a amplificação de um fragmento com 240 pb e o ADN de animais Tsp18^{wt/wt} (*WT*) apenas permite a amplificação de um fragmento com 130 pb. Os produtos destas reações foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 56).

Os descendentes F3 homozigóticos resultantes dos cruzamentos entre animais F2 Tsp18^{lox/wt}-*VE-Cad-Cre-ERT²* ou Tsp18^{lox/wt}-*CAGG-Cre-ERTM* entre si foram ainda genotipados para a presença da recombinase Cre tal como descrito acima.

No decorrer do trabalho, um dos oligonucleótidos usados na reação anterior (Tsp18HOMO) esgotou-se e não foi possível voltar a ter esta reação a funcionar com o novo lote. Assim, aproveitamos para desenhar uma outra reação em cadeia da polimerase (Tsp18LoxI3), mais simples, com apenas dois oligonucleótidos iniciadores (Tsp18loxI3FW2 e Tsp18loxI3REV2) para seleção dos descendentes F3 homozigóticos. Nesta reação, o ADN de animais Tsp18^{lox/wt} (heterozigóticos) permite a amplificação de dois fragmentos, com 210 pb (alelo *WT*) e 253 pb (alelo mutante). O ADN de animais Tsp18^{lox/lox} (homozigóticos) apenas permite a amplificação de um fragmento com 253 pb e o ADN de animais Tsp18^{wt/wt} (*WT*) apenas permite a amplificação de um fragmento com 210 pb. A diferença entre o tamanho do alelo mutante e o

Figura 57 - Genotipagem dos descendentes F3 com o PCR Tsp18LoxI3. Fotografia de gel de agarose a 2%, após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (1) e dos produtos da reação em cadeia da polimerase Tsp18loxI3, que permite a amplificação de fragmentos com 253 e 210 pb correspondentes aos alelos mutante e *WT*, respetivamente, usando como molde: ADN genómico de um animal F3 Tsp18^{lox/lox} (2); ADN genómico do clone de CEEs 1.11C (3); ADN genómico do clone de CEEs 1.12B (4); ADN genómico da quimera # 9 (5); ADN genómico de um animal *WT* (6) e água (7).

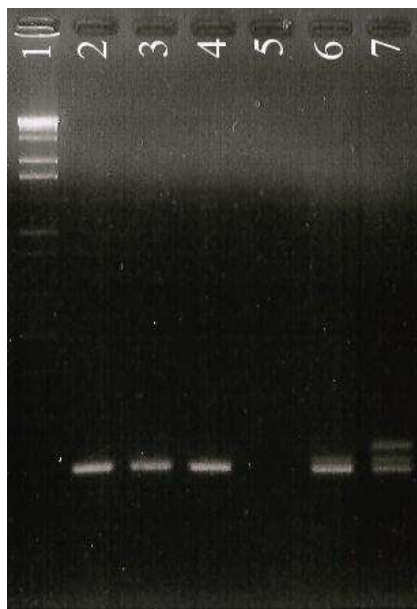


alelo *WT* corresponde ao tamanho do local *loxP* introduzido no intrão 3. Começamos por fazer uma reação teste em que usamos como molde ADN extraído de cauda de animais que davam homozigóticos pela reação de PCR Tsp18HOMO e também ADN de dois dos clones de CEEs usados na agregação que deram origem a quimeras (1.11C e 1.12B). Os produtos destas reações foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 57).

A reação teste revelou-se surpreendente uma vez que apenas o ADN extraído do clone de células estaminais embrionárias 1.12B, que deu origem a quatro quimeras sem transmissão à descendência (# 2, # 3, # 4 e # 5), permitiu a amplificação dos dois fragmentos com o tamanho esperado. O ADN dos animais que tinham sido classificados como homozigóticos pelo PCR Tsp18HOMO e o ADN do clone de CEEs 1.11C apenas permitiu a amplificação do fragmento correspondente ao alelo selvagem, com 210 pb, indicando a ausência de um local *loxP* na posição esperada no intrão 3.

Figura 58 - Genotipagem das quimeras fundadoras com o PCR Tsp18LoxI3.

Fotografia de gel de agarose a 2%, após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (1) e dos produtos da reação em cadeia da polimerase Tsp18LoxI3 que permite a amplificação de fragmentos com 253 e 210 pb correspondentes aos alelos mutante e *WT*, respetivamente, usando como molde: ADN genómico da quimera # 8 (2), # 9 (3) e # 12; água (4); ADN genómico do clone de CEEs 1.11C (6) e 1.12B (7).

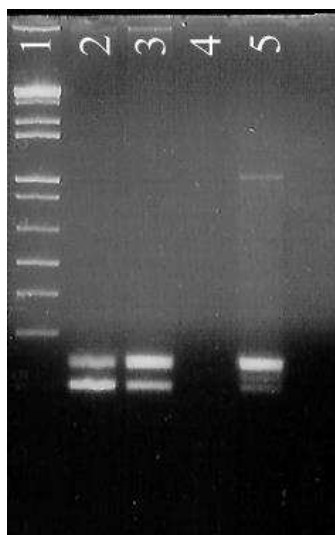


Esta reação de PCR foi repetida usando como molde ADN das 3 quimeras que tiveram transmissão à descendência, as # 8, # 9 e # 12, e que resultaram da agregação de embriões da estirpe CD-1 nova com o clone de CEEs 1.11C. Após eletroforese em gel de agarose, confirmou-se o resultado anterior, e apenas foi possível obter o fragmento correspondente ao alelo *WT* (Figura 58). Usando como molde amostras de ADN extraídas das caudas das quimeras # 2 e # 3, que resultaram da agregação com o clone de CEEs 1.12B, foi possível amplificar quer

o alelo mutante (253 pb) quer o alelo *WT* (210 pb) (Figura 59). Contudo, como foi referido, estas quimeras apesar de férteis, não tiveram descendentes *agouti*.

Este resultado veio revelar que os animais F2 e F3 obtidos não tinham o primeiro local *loxP* no intrão 3, essencial para a excisão do codão de iniciação no exão 4 do *tspan18* por ação da recombinase Cre.

Figura 59 - Genotipagem das quimeras sem descendência *agouti* com o PCR Tsp18LoxI3. Fotografia de gel de agarose a 2%, após eletroforese do marcador de pesos moleculares 1 Kb+ DNA ladder (1) e dos produtos da reação em cadeia da polimerase Tsp18loxI3, que permite a amplificação de fragmentos com 253 e 210 pb correspondentes aos alelos mutante e *WT*, respetivamente, usando como molde: ADN genómico das quimera # 2 (2) e # 3 (3); água (4) e ADN genómico do clone de CEEs 1.12B (5).



4.3.9. Sequenciação do braço esquerdo de homologia – ausência do primeiro *loxP* nas quimeras com transmissão à descendência

Para averiguar se o local *loxP* não estaria noutra região do braço esquerdo de homologia, começámos por fazer uma reação de PCR (Tsp18LA) que nos permitia amplificar todo o braço esquerdo de homologia (veja-se 3.5.6.). O produto da reação obtido (5583 pb) quando usámos como molde ADN genómico dos clones de células embrionárias estaminais 1.11C e 1.12B, foi enviado para sequenciação pelos serviços da STABVIDA (veja-se 3.5.20.1.).

Como a sequência devolvida se apresentava bastante incompleta, nomeadamente o produto resultante da amplificação a partir dos oligonucleótidos iniciadores Tsp18LAFW2, Tsp18LAFW6 e Tsp18LAREV2, e os serviços avisaram-nos que o produto de PCR rececionado estava um pouco degradado (oligonucleótidos muito extensos estão mais sujeitos a degradação das suas extremidades), tentámos clonar este produto em pGEM®-T easy de modo a torná-lo mais estável. Como ao fim de duas tentativas esta clonagem não teve sucesso, decidimos clonar

Com o tempo disponível para completar os trabalhos apenas foi possível clonar a região adjacente ao locus *loxP* flanked. Para tal, começámos por realizar um PCR (Tsp18LA3) com um oligonucleótido iniciador direto (Tsp18loxI3FW2) que se liga imediatamente a montante do *loxP* do intrão 3 e um oligonucleótido iniciador inverso que se liga na cassette de seleção negativa (Tsp18REVneoV5). Este par de *primers* permite a amplificação das últimas 2667 pb do braço esquerdo de homologia. O produto de PCR resultante da utilização de ADN genómico dos clones 1.11C, 1.12B e de um animal F3 homozigótico (pelo PCR Tsp18HOMO), como molde, foi depois clonado em pGEM®-T easy e usado para transformar células competentes. Após confirmação (por digestões com endonucleases de restrição) das colónias de *E. coli* que integraram o vetor de recombinação correto, amplificámos o ADN plasmídico e enviámos para sequenciação pelos serviços da STABVIDA (veja-se 3.5.20.2.).

Figura 60 - Confirmação da ausência do local *loxP* do intrão 3 por sequenciação. Alinhamento da sequência prevista do vetor Tspan18cKO (*Query*, linha superior) com a sequência devolvida pelos serviços de sequenciação (*Subject*, linha inferior) para o ADN genómico da mesma região de um animal F3 homozigótico (A), do clone de CEE 1.11C (B) e do clone de CEE 1.12B (C).

A				B				C			
Score	Expect	Identities	Strand	Score	Expect	Identities	Strand	Score	Expect	Identities	Strand
4547 bits (5042)	0.0	2604/2608 (98%)	51/2608 (1%)	4103 bits (4550)	0.0	2508/2674 (94%)	Gaps 123/2674 (4%)	4699 bits (5210)	0.0	2647/2668 (99%)	Gaps 9/2668 (0%)
Plus/Plus				Plus/Plus				Plus/Plus			
Query 1	CCATAGATGCTGTATGAGTGAGTGATATCCAGGCAACTTACAGCTTACAGATTTAGATTTG	60	Query 1	CCATAGATGCTGTATGAGTGAGTGATATCCCGAGCAACTTACAGCTTACAGATTTAGATTTG	60	Query 1	CCATAGATGCTGTATGAGTGAGTGATATCCAGGCAACTTACAGCTTACAGATTTAGATTTG	60			
Subject 1	CCATAGATGCTGTATGAGTGAGTGATATCCAGGCAACTTACAGCTTACAGATTTAGATTTG	60	Subject 1	CCATAGATGCTGTATGAGTGAGTGATATCCCGAGCAACTTACAGCTTACAGATTTAGATTTG	60	Subject 1	CCATAGATGCTGTATGAGTGAGTGATATCCAGGCAACTTACAGCTTACAGATTTAGATTTG	60			
Query 61	TGTGTTTGTCAGAACAGACCCCTCAAGGCTCAGAGTTTATCTTACCTAAAGAGCATAT	120	Query 61	TGTGTTTGTCAGAACAGACCCCTCAAGGCTCAGAGTTTATCTTACCTAAAGAGCATAT	120	Query 61	TGTGTTTGTCAGAACAGACCCCTCAAGGCTCAGAGTTTATCTTACCTAAAGAGCATAT	120			
Subject 61	TGTGTTTGTCAGAACAGACCCCTCAAGGCTCAGAGTTTATCTTACCTAAAGAGCATAT	120	Subject 61	TGTGTTTGTCAGAACAGACCCCTCAAGGCTCAGAGTTTATCTTACCTAAAGAGCATAT	120	Subject 61	TGTGTTTGTCAGAACAGACCCCTCAAGGCTCAGAGTTTATCTTACCTAAAGAGCATAT	120			
Query 121	TGGATGTCATGATCATATAGCATAGAGACCTCTTGCGGTTGCGGTGGAGGATCTTGCGG	180	Query 121	TGGATGTCATGATCATATAGCATAGAGACCTCTTGCGGTTGCGGTGGAGGATCTTGCGG	180	Query 121	TGGATGTCATGATCATATAGCATAGAGACCTCTTGCGGTTGCGGTGGAGGATCTTGCGG	180			
Subject 121	TGGATGTCATGATCATATAGCATAGAGACCTCTTGCGGTTGCGGTGGAGGATCTTGCGG	180	Subject 121	TGGATGTCATGATCATATAGCATAGAGACCTCTTGCGGTTGCGGTGGAGGATCTTGCGG	180	Subject 121	TGGATGTCATGATCATATAGCATAGAGACCTCTTGCGGTTGCGGTGGAGGATCTTGCGG	180			
Query 181	ATTAATATCATATCTTGATATGATACATATACGAGATATATGAATATTC	240	Query 181	ATTAATATCATATCTTGATATGATACATATACGAGATATATGAATATTC	240	Query 181	ATTAATATCATATCTTGATATGATACATATACGAGATATATGAATATTC	240			
Subject 181	ATTAATATCATATCTTGATATGATACATATACGAGATATATGAATATTC	240	Subject 181	ATTAATATCATATCTTGATATGATACATATACGAGATATATGAATATTC	240	Subject 181	ATTAATATCATATCTTGATATGATACATATACGAGATATATGAATATTC	240			
Query 241	TGGACAAACATCTCCATCCCTATCCCTGCGGTTTCTTGATAGAGGCACTATGAGAGCA	300	Query 241	TGGACAAACATCTCCATCCCTATCCCTGCGGTTTCTTGATAGAGGCACTATGAGAGCA	300	Query 241	TGGACAAACATCTCCATCCCTATCCCTGCGGTTTCTTGATAGAGGCACTATGAGAGCA	300			
Subject 241	TGGACAAACATCTCCATCCCTATCCCTGCGGTTTCTTGATAGAGGCACTATGAGAGCA	300	Subject 241	TGGACAAACATCTCCATCCCTATCCCTGCGGTTTCTTGATAGAGGCACTATGAGAGCA	300	Subject 241	TGGACAAACATCTCCATCCCTATCCCTGCGGTTTCTTGATAGAGGCACTATGAGAGCA	300			
Query 301	ACTTCACAGCTCTTGCGACCTGCTTCCCTCCGCCACCAACCATGAGAGGCTGCGG	360	Query 301	ACTTCACAGCTCTTGCGACCTGCTTCCCTCCGCCACCAACCATGAGAGGCTGCGG	360	Query 301	ACTTCACAGCTCTTGCGACCTGCTTCCCTCCGCCACCAACCATGAGAGGCTGCGG	360			
Subject 301	ACTTCACAGCTCTTGCGACCTGCTTCCCTCCGCCACCAACCATGAGAGGCTGCGG	360	Subject 301	ACTTCACAGCTCTTGCGACCTGCTTCCCTCCGCCACCAACCATGAGAGGCTGCGG	360	Subject 301	ACTTCACAGCTCTTGCGACCTGCTTCCCTCCGCCACCAACCATGAGAGGCTGCGG	360			
Query 361	TTCCACAGCATACATCTTGCGCTTGCGAGCTGCGGCTCTTGCCATCTCTCCGCGGCA	420	Query 361	TTCCACAGCATACATCTTGCGCTTGCGAGCTGCGGCTCTTGCCATCTCTCCGCGGCA	420	Query 361	TTCCACAGCATACATCTTGCGCTTGCGAGCTGCGGCTCTTGCCATCTCTCCGCGGCA	420			
Subject 361	TTCCACAGCATACATCTTGCGCTTGCGAGCTGCGGCTCTTGCCATCTCTCCGCGGCA	420	Subject 361	TTCCACAGCATACATCTTGCGCTTGCGAGCTGCGGCTCTTGCCATCTCTCCGCGGCA	420	Subject 361	TTCCACAGCATACATCTTGCGCTTGCGAGCTGCGGCTCTTGCCATCTCTCCGCGGCA	420			
Query 421	CTAAGAGGCTTTATATATATCTGCTGTTCTTGCAAACTCATCATCTCTGATGAGGTT	480	Query 421	CTAAGAGGCTTTATATATCTGCTGTTCTTGCAAACTCATCATCTCTGATGAGGTT	480	Query 421	CTAAGAGGCTTTATATATATCTGCTGTTCTTGCAAACTCATCATCTCTGATGAGGTT	480			
Subject 421	CTAAGAGGCTTTATATATATCTGCTGTTCTTGCAAACTCATCATCTCTGATGAGGTT	480	Subject 421	CTAAGAGGCTTTATATATCTGCTGTTCTTGCAAACTCATCATCTCTGATGAGGTT	480	Subject 421	CTAAGAGGCTTTATATATATCTGCTGTTCTTGCAAACTCATCATCTCTGATGAGGTT	480			
Query 481	TGTTCTGCAGTCATGACAGCAAGAGATCTGCGAGCATCTGAAAAGAGGCTCTCTCC	540	Query 481	TGTTCTGCAGTCATGACAGCAAGAGATCTGCGAGCATCTGAAAAGAGGCTCTCTCC	540	Query 481	TGTTCTGCAGTCATGACAGCAAGAGATCTGCGAGCATCTGAAAAGAGGCTCTCTCC	540			
Subject 481	TGTTCTGCAGTCATGACAGCAAGAGATCTGCGAGCATCTGAAAAGAGGCTCTCTCC	540	Subject 481	TGTTCTGCAGTCATGACAGCAAGAGATCTGCGAGCATCTGAAAAGAGGCTCTCTCC	540	Subject 481	TGTTCTGCAGTCATGACAGCAAGAGATCTGCGAGCATCTGAAAAGAGGCTCTCTCC	540			
Query 541	TGGGAGGAGCTTTTCTTCCGATTCAGAAACATGCGCCCAACGACTGAGATATAGG	600	Query 541	TGGGAGGAGCTTTTCTTCCGATTCAGAAACATGCGCCCAACGACTGAGATATAGG	600	Query 541	TGGGAGGAGCTTTTCTTCCGATTCAGAAACATGCGCCCAACGACTGAGATATAGG	600			
Subject 541	TGGGAGGAGCTTTTCTTCCGATTCAGAAACATGCGCCCAACGACTGAGATATAGG	600	Subject 541	TGGGAGGAGCTTTTCTTCCGATTCAGAAACATGCGCCCAACGACTGAGATATAGG	600	Subject 541	TGGGAGGAGCTTTTCTTCCGATTCAGAAACATGCGCCCAACGACTGAGATATAGG	600			
Query 601	GCGTGAAGTTCTTGAGCTGTTCCGCGGTTGCGGAGATACAGAGATTAATAGAGTTTGCGT	660	Query 601	GCGTGAAGTTCTTGAGCTGTTCCGCGGTTGCGGAGATACAGAGATTAATAGAGTTTGCGT	660	Query 601	GCGTGAAGTTCTTGAGCTGTTCCGCGGTTGCGGAGATACAGAGATTAATAGAGTTTGCGT	660			
Subject 601	GCGTGAAGTTCTTGAGCTGTTCCGCGGTTGCGGAGATACAGAGATTAATAGAGTTTGCGT	660	Subject 601	GCGTGAAGTTCTTGAGCTGTTCCGCGGTTGCGGAGATACAGAGATTAATAGAGTTTGCGT	660	Subject 601	GCGTGAAGTTCTTGAGCTGTTCCGCGGTTGCGGAGATACAGAGATTAATAGAGTTTGCGT	660			
Query 661	GCGTGAAGGATTCGATGAGAGCAAGCACTGATACAGATATCTTCCGATGAGAAATCCC	720	Query 661	GCGTGAAGGATTCGATGAGAGCAAGCACTGATACAGATATCTTCCGATGAGAAATCCC	720	Query 661	GCGTGAAGGATTCGATGAGAGCAAGCACTGATACAGATATCTTCCGATGAGAAATCCC	720			
Subject 661	GCGTGAAGGATTCGATGAGAGCAAGCACTGATACAGATATCTTCCGATGAGAAATCCC	720	Subject 661	GCGTGAAGGATTCGATGAGAGCAAGCACTGATACAGATATCTTCCGATGAGAAATCCC	720	Subject 661	GCGTGAAGGATTCGATGAGAGCAAGCACTGATACAGATATCTTCCGATGAGAAATCCC	720			

252

5. DISCUSSÃO

As terapias anti-angiogénicas têm vindo a ser introduzidas lentamente nos protocolos terapêuticos oncológicos por serem promissoras adjuvantes à quimioterapia existente. Contudo, pouco se sabe sobre como é que estes diferentes tipos de abordagem terapêutica interagem entre si e conseguem o bloqueio ou mesmo a remissão dos tumores tratados.

A terapia anti-Dll4 tem um mecanismo de ação à primeira vista paradoxal. Funciona como uma terapia pró-angiogénica, na medida em que aumenta a densidade vascular, mas conduz à formação de uma neo-vasculatura tumoral mal estruturada, incapaz de transportar sangue, deixando o tecido tumoral numa situação de hipóxia e consequente limitação de crescimento.

A sinalização Notch tem sido cada vez mais associada à progressão do cancro da próstata (A.-R. Pedrosa et al., 2016) mas a contribuição específica de Dll4 ainda não foi elucidada.

Os nossos dois principais objetivos consistiam em estudar, pela primeira vez, a eficácia da terapia anti-Dll4 em diferentes fases de progressão tumoral e o resultado da combinação terapêutica entre uma formulação anti-Dll4 e um agente citostático, nomeadamente a doxorrubicina, para avaliar o potencial benefício desta combinação no tratamento do cancro.

Para avaliar a eficácia do sDll4Fc no tratamento do cancro prostático, decidimos usar o modelo murino TRAMP. Este modelo animal, imunocompetente, desenvolve um adenocarcinoma prostático de forma espontânea que progride por etapas patofisiológicas semelhantes às que ocorrem no homem. Tendo em conta estas características do modelo, decidimos testar a eficácia terapêutica em duas fases diferentes da progressão tumoral. Numa primeira fase, correspondente a um contexto de diagnóstico precoce da doença nos homens, as próstatas dos murganhos TRAMP com 12 a 18 semanas de idade, apresentam PIN e adenocarcinomas pequenos bem a moderadamente diferenciados. Numa segunda fase, correspondente a um contexto de diagnóstico tardio da doença nos homens, as próstatas dos murganhos TRAMP com 18 a 24 semanas de idade apresentam adenocarcinomas de maior dimensão, moderadamente a pouco diferenciados.

Primeiro analisámos o padrão de expressão de Dll4 em próstatas de murganhos normais e de murganhos TRAMP. A expressão endotelial foi óbvia em ambas, e verificou-se expressão epitelial quer nas próstatas normais quer nas próstatas de murganhos TRAMP com 18 e 24 semanas de idade. Esta observação indicou-nos que Dll4 deveria ser avaliado como alvo terapêutico no adenocarcinoma prostático.

A terapia com sDll4Fc revelou-se eficaz em ambas as janelas terapêuticas. Para determinar o seu efeito no crescimento tumoral, pesámos as próstatas dos animais tratados no final da experiência e comparámos com o peso médio de próstatas de animais C57BL/6 da mesma idade

(que representou assim o peso de referência da glândula prostática murina normal); a diferença entre estes pesos foi assumida como sendo devida ao crescimento tumoral prostático.

As diferenças de peso registadas revelaram que a terapia com sDll4Fc conduziu a um crescimento tumoral 5 vezes inferior, quando comparado com murganhos TRAMP controlo (tratados com PBS), nas 6 semanas de terapia intervenção aplicada num contexto de diagnóstico precoce da doença. Comparativamente, nas 6 semanas de terapia de intervenção aplicada num contexto de diagnóstico tardio da doença, a terapia com sDll4Fc conduziu a um crescimento tumoral 9 vezes inferior quando comparado com murganhos TRAMP controlo (tratados com PBS). A análise da angiogénese tumoral, nos dois contextos terapêuticos, revelou que o aumento efetivo da densidade vascular foi de 85% na intervenção precoce e mais de 100% na intervenção tardia. Uma vez que a dose de sDll4Fc foi a mesma em ambos os ensaios, comparámos a densidade vascular de referência (de tumores prostáticos de animais TRAMP controlo) em ambas as janelas terapêuticas e de facto esta é 30% superior na fase tardia da progressão tumoral. Nesta mesma fase, os transcritos de ARN para VEGF-A e VEGF-C também se apresentam aumentados 2,3 e 1,7 vezes, respetivamente, quando comparados com a fase precoce. Esta observação conduziu-nos à hipótese de que a terapia com sDll4Fc é mais eficaz em tumores com neo-angiogénese pronunciada e com maior estimulação angiogénica por sinalização VEGF. O sDll4Fc não só foi mais eficaz na limitação do crescimento endotelial tumoral na intervenção tardia, mas resultou também numa redução mais acentuada do recrutamento de células murais e da perfusão vascular, assim como num maior aumento da extravasação vascular comparativamente ao ensaio de intervenção precoce. O fenótipo angiogénico resultante da administração de sDll4Fc foi assim mais forte num contexto em que a neo-angiogénese se encontra mais ativa apesar de produzir um forte efeito antitumoral em ambas as janelas terapêuticas. O fato de o estadiamento (ou gradação) tumoral não se ter alterado com a terapia com sDllFc poderá indicar que a função epitelial deDll4 não está envolvida na progressão tumoral ou é simplesmente resultante da natureza autóctone dos tumores TRAMP que têm um estímulo neoplásico contínuo.

Estudos recentes revelaram que a terapia anti-angiogénica baseada em VEGF pode reduzir a disponibilidade de outros fármacos no tecido tumoral. Uma vez que os agentes anti-Dll4 funcionam no sentido oposto ao dos fármacos anti-VEGF e que os agentes anti-angiogénicos são frequentemente administradas como adjuvantes ou como terapias concomitantes a fármacos citostáticos, é importante estudar a interação terapêutica entre o sDll4Fc e fármacos quimioterapêuticos. Neste trabalho testámos este tipo de interação apenas num contexto de diagnóstico tardio por a eficácia terapêutica do sDll4Fc ser superior nessa janela temporal e por a resposta angiogénica básica ser semelhante em ambos os contextos. Como citostático

decidimos usar a doxorrubicina, um membro da família das antraciclinas que se tem revelado eficaz quando administrada numa fase mais tardia da progressão tumoral prostática, uma vez que, numa fase precoce, apenas cerca de 10% a população celular tumoral se encontra em proliferação ativa. Apesar de a monoterapia com doxorrubicina ter reduzido o crescimento tumoral prostático 2,6 vezes, a sua combinação com sDll4Fc conseguiu reduzir o peso total da próstata dos murganhos TRAMP a um ponto que se tornou estatisticamente indistinto do peso médio da próstata de ratinhos C57BL/6 com a mesma idade. Contudo, isto não significa a ausência completa de tumores uma vez que foram detetados pequenos tumores que se encontravam no mesmo estágio de desenvolvimento histopatológico que os dos outros grupos em tratamento. Uma vez que a massa tumoral dos murganhos TRAMP tratados com a combinação sDll4Fc+doxorrubicina, às 24 semanas se apresentava mais baixo do que o dos tumores de murganhos TRAMP não tratados às 18 semanas, quando a terapia foi iniciada, acreditamos que isto significa que, a terapia de combinação de sDll4Fc com doxorrubicina, não só reduziu o crescimento tumoral como ainda resultou em regressão tumoral.

Para tentar compreender porque é que a terapia de combinação resulta num efeito mais pronunciado do que cada uma das terapias isoladamente, avaliámos marcadores de função vascular como a perfusão e a extravasação. Em ambos os ensaios de intervenção terapêutica a perfusão vascular apresentou-se diminuída, contudo, este efeito foi mais acentuado na intervenção tardia do que na intervenção precoce e ainda mais significativo na terapia de combinação do que em qualquer uma das monoterapias. Acreditamos que estas observações resultem do aumento da densidade vascular acompanhado da redução do recrutamento de células murais nos vasos tumorais recém-formados, que se acabam por se traduzir em níveis crescentes de mal funcionamento vascular. A extravasação vascular apresentou-se aumentada em todos os contextos terapêuticos testados, mas no caso da intervenção tardia aumentou 100% relativamente à intervenção precoce e aumentou mais 50% no caso da terapia de combinação quando comparada com a da monoterapia com sDll4Fc. Uma vez que o sDll4Fc atua por promover a formação de uma neo-vasculatura não-funcional, revelou-se importante avaliar o seu efeito na disponibilidade tumoral de agentes antitumorais administradas por via sistémica. Assim, avaliámos a concentração de doxorrubicina na próstata, tendo os resultados revelado que a administração combinada com sDll4Fc conduzia a uma concentração intratumoral da doxorrubicina 3,8× superior à obtida com a monoterapia. É possível que a disponibilidade tumoral de doxorrubicina seja mais influenciada pela extravasação aumentada do que pela redução da função vascular, de tal modo que resulta num aumento da disponibilidade tumoral deste fármaco no contexto da combinação.

A doxorrubicina atua primariamente por inibir a atividade da topoisomerase II, conduzindo ao bloqueio da proliferação das células em rápida divisão. Este fármaco apresenta também um efeito imunomodulador, através do qual potencia as respostas pelos linfócitos T citotóxicos e a atividade tumoricida dos macrófagos, contribuindo para aumentar ainda mais o seu efeito antitumoral.

Uma vez que o ligando Dll4 é conhecido por atuar como um regulador das funções dos macrófagos e dos linfócitos, decidimos avaliar se a combinação de sDll4Fc e doxorrubicina também afetaria este efeito terapêutico. Na terapia de combinação com sDll4Fc, as frequências esplênicas de linfócitos B e T não foram significativamente afetadas, mas as frequências das populações de granulócitos/monócitos apresentaram-se significativamente aumentadas. Uma vez que os macrófagos são ativados por e transportam doxorrubicina para o tecido tumoral, acreditamos que este resultado significa que a administração combinada com sDll4Fc afeta positivamente este aspeto da função da doxorrubicina, promovendo um aumento do seu efeito antitumoral.

A presença de células neoplásicas disseminadas no momento do diagnóstico do tumor primário está quase invariavelmente associada a um mau prognóstico. O desenvolvimento de metástases é por isso a principal causa de morte em pacientes oncológicos.

A maioria das terapias antitumorais baseadas na anti-angiogénese, atualmente aprovadas para uso clínico, inclui a doença metastática nas suas indicações apesar de não ser testada a sua eficácia em modelos metastáticos pré-clínicos relevantes. Além disso, a sugestão de que a terapia anti-angiogénica pode estar associada ao desenvolvimento de metástases tem suscitado um intenso debate na comunidade científica.

São necessários modelos tumorais *in vivo* mais preditivos de modo a ser possível elucidar quer a eficácia, quer o mecanismo de ação, dos agentes anti-angiogénicos desenvolvidos recentemente. Além da complexidade inerente ao processo metastático existem questões de natureza logística que dificultam a modelação da metastização *in vivo*. Diferentes modelos permitem obter informação sobre diferentes etapas da metastização. Mesmo os modelos murinos geneticamente modificados que desenvolvem metástases de forma espontânea, não reproduzem a complexidade e a diversidade de todas as mutações que ocorrem nos pacientes humanos. Os resultados obtidos com cada tipo de modelo devem por isso ser interpretados tendo em conta as vantagens e limitações de cada um.

A utilização de anticorpos anti-Dll4 tem um efeito duplamente benéfico na progressão tumoral. Além de conduzir ao desenvolvimento de uma vasculatura hiperplásica e disfuncional, também

conduz à redução da frequência de células tumorais estaminais (Hoey et al., 2009). Contudo, o papel do ligando Dll4 na metastização ainda não foi completamente esclarecido.

Num estudo recente, foi desenvolvido um modelo de melanoma ortotópico em murganhos NOD/SCID implantando intradermicamente células de melanoma humano derivadas diretamente de pacientes oncológicos (Beviglia et al., 2011). Os autores verificaram que estes tumores mantêm muitas das características humanas originais, nomeadamente a heterogeneidade neoplásica, o fenótipo e a capacidade para formar metástases nos pulmões, linfonodos, fígado, intestinos e cérebro, recapitulando a invasividade encontrada na clínica. Neste modelo, a utilização de um anticorpo anti-Dll4 levou à inibição quer do crescimento do tumor primário, quer das metástases nos pulmões, fígado, intestino e cérebro (Beviglia et al., 2011). Além disso, a utilização do anticorpo anti-Dll4 em combinação com paclitaxel teve um efeito ainda mais acentuado na redução da metastização para o fígado e intestino. Estes resultados estabelecem uma relação direta entre a redução da frequência de CSCs e a inibição concomitante da metastização (Beviglia et al., 2011).

O segundo trabalho experimental teve como principal objetivo validar modelos murinos de metastização para averiguar a função especificamente endotelial do gene *Dll4* quer nos processos de invasão e intravasação, quer na progressão de micrometástases para macrometástases.

O melanoma maligno é um dos tipos tumorais mais agressivos, com propensão precoce para a formação de metástases regionais e distantes, tendo já sido demonstrado que a angiogénese é uma característica fundamental da progressão maligna e crescimento de tumores primários de melanoma (Cadili, 2009; Fallowfield & Cook, 1991; Marcoval et al., 1997).

Nos melanomas, parece existir uma correlação significativa entre o desenvolvimento de mais metástases e o aumento de expressão do VEGF (e da consequente maior densidade vascular) nas lesões tumorais primárias (Neitzel et al., 1999; Pötgens et al., 1995). Neste tipo de cancro, os níveis de VEGF parecem apresentar uma correlação positiva com a espessura do tumor primário, um dos principais fatores preditores de metastização (Bayer-Garner, Hough, & Smoller, 1999; Marcoval et al., 1997). Foi também verificado que os níveis do VEGF se encontram mais elevados nas colónias metastáticas de melanoma do que no tumor primário (Breslow, 1970). A angiogénese desempenha um papel crítico quer na metastização hematogena quer na metastização linfática dos melanomas. Evidências mais recentes sugerem que a expressão do VEGF-C (Boone et al., 2008; Schietroma et al., 2003) e a linfangiogénese tumoral (Massi et al., 2006) são preditivas da metastização dos melanomas para os linfonodos. A linha celular de melanoma murino B16-F10 é uma das mais usadas para estudar as propriedades das células neoplásicas e/ou dos seus hospedeiros singénicos, que determinam os

padrões de metastização, sobrevivência em circulação e progressão de micro para macrometástases (Eklund et al., 2013; Fidler, 1973, 1975).

Foi também demonstrado que a linha celular B16-F10 é altamente angiogénica *in vivo*. A transfeção destas células de melanoma murino com o gene supressor tumoral *p53*, pode reverter o seu fenótipo angiogénico e inibir o crescimento tumoral através da sub-regulação do VEGF e sobreexpressão da TSP-1 (Ajay Gautam, Densmore, Melton, Golunski, & Waldrep, 2002).

Assim, tendo em conta o fenótipo angiogénico do melanoma, de modo a elucidar o papel endotelial do ligando Dll4 nas várias etapas da metastização, começámos por tentar estabelecer um modelo de metastização espontânea implantando células de melanoma murino B16-F10 numa localização subcutânea e intradérmica em murganhos singénicos.

Inicialmente a remoção cirúrgica completa do tumor primário era vista como a principal abordagem terapêutica pois pensava-se que eliminando a fonte de células neoplásicas se eliminaria por completo a doença. Hoje sabe-se que, muito antes de um tumor primário se tornar sintomático, já disseminou células neoplásicas para o resto do corpo (Klein et al., 2002) e clinicamente as metástases são frequentemente diagnosticadas apenas meses ou anos após a remoção cirúrgica de um tumor primário (L. Weiss, 2000). Por outro lado, os tumores produzem e secretam diversas proteínas que podem estimular ou inibir a angiogénese, a qual é determinada pelo equilíbrio entre fatores pró- e anti-angiogénicos (D. Hanahan & Folkman, 1996). No local metastático, este equilíbrio é governado pelos fatores pró e anti-angiogénicos sintetizados quer pelas células neoplásicas metastáticas, quer pelo tumor primário (Ramanujan, Koenig, Padera, Stoll, & Jain, 2000). Do mesmo modo, a inibição do crescimento metastático por alguns tumores primários é atribuível a maiores concentrações distais de inibidores da angiogénese. Estes efeitos contrastantes implicam que os tumores produzem fatores opostos que produzem resultados diferentes local e remotamente (Ramanujan et al., 2000). O tratamento local do tumor primário pode por isso modificar o equilíbrio entre estes fatores no local metastático e desse modo influenciar o crescimento metastático (Demicheli, Retsky, Hrushesky, Baum, & Gukas, 2008; J Folkman, 1995; Rofstad et al., 2004).

No sentido de tentar mimetizar melhor o que se verifica na prática clínica e tendo em conta o efeito da presença do tumor primário na progressão de micro para macrometástases, decidimos remover cirurgicamente os tumores primários formados após implantação subcutânea e intradérmica e aguardar pelo desenvolvimento das metástases.

Apesar de estar documentada a metastização pulmonar espontânea a partir de células B16-F10 implantadas subcutaneamente, nas nossas condições experimentais não foi possível observar este fenótipo. Nos sete ensaios realizados, os dois animais que apresentaram metástases pulmonares, tinham também desenvolvido um novo tumor primário intrabdominal,

possivelmente devido a uma rutura accidental da parede abdominal durante a cirurgia para remoção do tumor primário inicial. Assim, assumimos que estas metástases se tenham desenvolvido por contacto com o novo tumor primário e não tenham resultado da disseminação hematogena a partir do tumor primário original.

Uma das principais limitações desta abordagem foi a elevada mortalidade associada à intervenção cirúrgica. Nos ensaios realizados, o momento da intervenção cirúrgica teve por base o compromisso entre o tempo necessário para desenvolver um tumor suficientemente agressivo, invasivo e angiogénico e o volume tumoral operável (quanto maior, mais friável e necrótico se torna, tornando quase impossível a sua remoção total no flanco, além de induzir o choque por grandes perdas de sangue) sem prejudicar o bem-estar animal.

Não conseguimos achar uma relação clara entre o volume tumoral primário no momento da intervenção e a mortalidade associada à cirurgia uma vez que num mesmo ensaio animais com maior volume tumoral sobreviviam e animais com menor volume tumoral morriam. Contudo, a maioria dos animais que sobreviveu à cirurgia tinha tumores com volume inferior a 350-450 mm³. Um outro problema foi a elevada recorrência tumoral. O desenvolvimento de um novo tumor primário, não nos permitiu perceber se a cirurgia teria ou não um efeito potenciador da progressão metastática. Os animais que não desenvolveram um novo tumor primário no local intervencionado também não tinham metástases pulmonares, contudo não temos dados suficientes que nos permitam inferir uma relação entre a presença ou não de um tumor primário e o desenvolvimento de metástases. Além disso, verificámos ainda uma maior morbilidade dos animais com recidiva, o que também nos condicionou o tempo até ao seu sacrifício. Um terceiro problema foi também a elevada variabilidade nos volumes tumorais primários, sobretudo nos primeiros ensaios, uma questão que dificultou bastante a decisão do melhor momento para realizar a cirurgia. Estes três problemas levaram assim a um número insuficiente de observações para cada conjunto de condições.

Os autores que referem a metastização pulmonar espontânea a partir de transplantes subcutâneos da linha celular B16-F10 utilizam como local de inoculação a orelha (Bobek et al., 2010; Jean et al., 2014), a cauda (Bobek et al., 2011; Shrayner et al., 1995) ou a almofada plantar, estando descrita a realização de cirurgia apenas dos transplantes subcutâneos na almofada plantar (L. Chen et al., 2009; Dawson et al., 2009; Hawkins et al., 2002; Nathanson et al., 1986), mais concretamente a realização da amputação do membro. Estes autores usaram inóculos entre 5×10^4 e 5×10^5 células B16-F10 e aguardaram entre 18 a 32 dias para realizar a amputação (alguns definem o momento da cirurgia pelo diâmetro que tumor primário atinge e não pelo tempo desde a inoculação), tendo sacrificado os animais 10 a 32 dias depois da cirurgia ou aguardado que os murganhos morressem naturalmente para verificar a presença de

macrometástases pulmonares. Relativamente às condições dos nossos ensaios de implantação subcutânea no flanco, o inóculo usado de 1×10^5 células B16-F10 está dentro do intervalo usado por outros autores na almofada plantar; o tempo que aguardámos até à realização da cirurgia foi inferior, 10 a 22 dias, o que pode ter limitado a quantidade de células neoplásicas disseminadas, contudo, como já foi referido, quanto mais tempo passava, maiores eram os tumores primários e maior a mortalidade associada à cirurgia. O tempo que aguardámos desde a cirurgia até sacrificar os animais, 14 a 30 dias, está também de acordo com os ensaios dos outros autores. Assim, as principais diferenças que encontramos relativamente às condições dos autores que verificaram o desenvolvimento de metástases pulmonares espontâneas, são a localização subcutânea, o tempo até à cirurgia e as características da cirurgia para remoção do tumor primário. Os autores que realizam a implantação subcutânea na almofada plantar removem o tumor primário por amputação do membro, uma cirurgia bem mais radical, mas que aparentemente é mais eficaz por não permitir a recidiva.

Nos modelos murinos de metastização, a localização do tumor primário parece ser uma condição crucial para o desenvolvimento de metástases. A implantação de células neoplásicas numa região que limita o crescimento e expansão do tumor primário, conduz à metastização linfática e hematogena precoce. Quando o espaço para o crescimento do tumor primário é limitado, o potencial de proliferação do tumor prevalece sobre a predisposição genética do tumor para crescer apenas em locais específicos. Estes aspetos foram elucidados nos modelos tumorais murinos em que as células B16-F10 foram implantadas entre a pele e a cartilagem da orelha e subcutaneamente na cauda (Bobek et al., 2010, 2011).

No presente trabalho a escolha da região do flanco para implantação subcutânea teve por base a experiência prévia na realização deste tipo de transplantes e ausência de experiência na realização de amputações. Este delineamento experimental apresentou ainda diversas falhas devido a condicionamentos logísticos. Nem sempre foi possível ter um número significativo de animais em cada ensaio. Além disso, também não foi sempre possível manter os animais alojados individualmente após as cirurgias. Idealmente deveriam ter sido realizados ensaios com momentos de intervenção cirúrgica bem definidos baseados quer no tempo de desenvolvimento quer no volume tumoral, além de se incluir um grupo controlo para um ensaio de sobrevivência.

O fracasso do modelo de metastização espontânea a partir da implantação subcutânea no flanco, levou-nos a tentar desenvolver um modelo de metastização espontânea a partir de transplantes ortotópicos (intradérmicos). Mais uma vez, e pelas mesmas razões, escolhemos a pele do flanco. Apesar da implantação ortotópica proporcionar condições que mimetizam melhor o microambiente tumoral original, promovendo desse modo um estabelecimento e invasão mais

eficientes das células neoplásicas transplantadas, o nosso modelo de implantação ortotópica na pele do flanco também não nos permitiu obter metástases pulmonares espontâneas. Neste modelo usámos inóculos celulares menores (3×10^4 e 5×10^4) do que no modelo subcutâneo no sentido de tentar ter mais tempo de desenvolvimento do tumor primário, contudo, verificámos volumes tumorais superiores (704 a 1091 mm³) num mais curto espaço de tempo (11 a 15 dias), possivelmente devido à localização intradérmica proporcionar condições mais favoráveis à proliferação desta linha celular. Neste modelo não verificámos tanta variabilidade no volume do tumor primário entre animais. Além disso também não houve mortalidade associada à cirurgia, contudo todos os animais recidivaram e nenhum animal desenvolveu metástases pulmonares.

Alguns autores defendem que o modelo mais ortotópico de metastização e crescimento de melanoma consiste na inoculação subdérmica de células de melanoma humano na cauda ou orelha de murganhos SCID imunodeprimidos (Rozenberg, Monahan, Torrice, Bear, & Sharpless, 2010). Além das vantagens conferidas pela limitação de espaço, a pele destas regiões apresenta uma distribuição de melanócitos semelhante à encontrada na pele humana. Note-se que existem diferenças significativas entre a pele humana e a pele dos murganhos, sobretudo no que diz respeito à distribuição dos melanócitos. Na pele humana, os melanócitos localizam-se predominantemente na junção da derme com a epiderme, existindo alguns também nos folículos pilosos (B. Young, 2014). Na pele dos murganhos, os melanócitos localizam-se sobretudo nos folículos pilosos ou na derme interfolicular com exceção da pele da cauda e das orelhas onde se localizam na camada basal da epiderme (Hogan, Beddington, Costantini, & Lacy, 1994a; Reynolds, 1954). Estas diferenças histológicas são bastante importantes considerando a influência que o microambiente tem quer na manutenção da homeostasia celular quer no desenvolvimento de tumores de origem humana. De fato, em murganhos Nude verifica-se uma maior incidência de metástases espontâneas após a implantação subdérmica de linhas de melanoma humano (Chishima et al., 1997; Cornil et al., 1989; Gattoni-Celli, Byers, Calorini, & Ferrone, 1993).

Como não conseguimos estabelecer um modelo de metastização espontânea adotámos um modelo de metastização experimental utilizado por diversos autores, a inoculação endovenosa de células B16-F10. Apesar deste modelo omitir as primeiras etapas da cascata de metastização, permite-nos avaliar as etapas de extravasação e colonização.

Após termos validado este modelo em murganhos C57BL/6 *WT*, realizámos o mesmo procedimento em murganhos transgênicos *Dll4^{lox/wt} -VE-Cadherin-Cre-ER^{T2}* para avaliar o papel do ligando Dll4 especificamente no endotélio, nas referidas etapas da metastização. Todos os murganhos (*Cre*⁺ e *Cre*⁻) foram induzidos com tamoxifeno durante 5 dias consecutivos;

depois da última administração aguardamos mais 8 dias para permitir a eliminação do tamoxifeno do organismo e só então inoculamos 2×10^5 células B16-F10 na veia da cauda. Com este procedimento, os animais Cre⁺ tornam-se heterozigóticos para Dll4 especificamente no endotélio e os animais Cre⁻ mantêm ambos os alelos Dll4. A contagem das metástases foi realizada dezoito dias depois.

A realização do modelo de metastização experimental em murganhos C57BL/6 permitiu-nos verificar que não existem diferenças no número médio de colónias metastáticas entre machos e fêmeas e permitiu-nos ainda conhecer o número médio de metástases expectável em animais transgênicos Cre⁻, estabelecendo assim uma base para comparação e quantificação do efeito da perda de um alelo *Dll4* no endotélio no caso dos Cre⁺.

Os ensaios de metastização experimental em murganhos transgênicos *Dll4^{lox/wt}-VE-Cadherin-Cre-ER^{T2}* incluíram machos e fêmeas, e este delineamento experimental permitiu-nos verificar um efeito do género na metastização. As fêmeas Cre⁺ apresentaram 6,2× menos metástases do que os machos com o mesmo genótipo. Do mesmo modo, as fêmeas Cre⁻ apresentaram 4,2× menos metástases do que os machos Cre⁻. Ambas as diferenças foram estatisticamente significativas. O fato de as fêmeas transgênicas induzidas desenvolverem menos metástases do que os machos transgênicos induzidos levou-nos a avaliar o efeito da deleção de um alelo *Dll4* no endotélio, por género. Assim, verificámos que, no caso das fêmeas, as Cre⁺ desenvolveram 2,7× menos metástases do que as Cre⁻ e no caso dos machos, os Cre⁺ desenvolveram 1,8× menos metástases do que os Cre⁻, diferenças estatisticamente significativas. Este resultado sugere assim uma função para a sinalização Notch/Dll4 endotelial na extravasão e/ou colonização metastática. O fato de se verificar um efeito mais acentuado no caso das fêmeas (2,7× menos, em comparação com 1,8× nos machos) pode resultar de um efeito inesperado do tamoxifeno apenas neste género. Ao contrário dos machos Cre⁻ (induzidos com tamoxifeno), que apresentaram um número de metástases semelhante (196 (51)) ao dos machos C57BL/6 *WT* (199(51)), as fêmeas Cre⁻ (induzidas com tamoxifeno) apresentaram significativamente menos (4,3× menos) (46 (27)) metástases do que as fêmeas C57BL/6 *WT* (201 (64)).

No modelo de metastização experimental, a heterozigotia endotelial para *Dll4* parece assim ser responsável pelo desenvolvimento de um menor número de macrometástases. Vários mecanismos poderão estar subjacentes a este fenótipo.

Foi já demonstrado que as células B16-F10 estimulam a angiogénese e que no caso do melanoma as metástases apresentam uma vascularização sanguínea superior à vascularização sanguínea do tumor primário, que parece depender mais de uma vascularização linfática (Mihic-Probst et al., 2012). Sendo a sinalização Dll4/Notch, em conjunto com a sinalização

VEGF, indispensável no processo do estabelecimento da identidade das células-ponta e das células-caule, a ausência de um dos seus alelos pode perturbar o processo angiogénico nas micrometástases e determinar assim a formação de uma rede vascular sanguínea ineficiente que limita o crescimento das macrometástases.

O ligando Dll4 sinaliza sobretudo através dos recetores Notch1 e Notch4. A ativação da via de sinalização Notch parece ser um dos mecanismos envolvidos na transformação neoplásica melanocítica (Hoek et al., 2004). Além disso, foi já demonstrado que a sinalização por Notch1 está ativada no melanoma humano e que esta ativação é necessária para a progressão do melanoma primário mediada por β -catenina (Balint et al., 2005). A regulação da atividade das vias MAPK/PI3K-Akt e sobreexpressão da N-caderina (e a consequente perda de expressão de E-caderina) são dois dos possíveis mecanismos subjacentes ao aumento da adesão, sobrevivência, crescimento e progressão dos melanomas quando a sinalização Notch é ativada (Z.-J. Liu et al., 2006).

Assim, nos animais heterozigóticos para Dll4, especificamente no endotélio, pode existir uma redução da ativação de Notch1 nas células de melanoma que leva à sua menor capacidade de sobrevivência e proliferação no local metastático, sendo esta outra das possíveis explicações para fenótipo metastático observado no modelo de metastização experimental (note-se que, pelo menos em humanos, as células de melanoma não expressam Dll4 (Pontén, Jirström, & Uhlen, 2008; Uhlen et al., 2015; Uhlén et al., 2005; www.proteinatlas.org, 2016)).

O género dos animais hospedeiros pode ter um efeito profundo na metastização, sobretudo no caso de células neoplásicas responsivas a hormonas. No caso de tumores que não dependem de hormonas, como o cancro do pulmão e o melanoma, não é expectável que o género tenha um impacto no potencial metastático (Welch, 1997). Contudo, algumas observações sugerem o contrário. Foi demonstrado que as células de melanoma B16 crescem mais lentamente em fêmeas singénicas C57BL/6 do que em machos singénicos (Proctor et al., 1981). A explicação mais comum para as diferenças no potencial metastático nestas experiências reside no papel das hormonas sexuais, contudo, são necessárias provas adicionais. De acordo com esta noção de que as hormonas podem estar envolvidas na capacidade metastática, verificou-se que fenótipos associados à metastização, como a expressão de inibidores tecidulares das metaloproteinases (TIMPs) pode ser transcricionalmente regulada por recetores hormonais (van den Brûle et al., 1992). Apesar de estar descrito este efeito da sinalização hormonal, no caso dos nossos animais C57BL/6 *WT*, não conseguimos verificar diferenças no número de focos metastáticos pulmonares em machos e fêmeas inoculados na veia da cauda com células B16-F10. Contudo, no caso dos animais induzidos, verificámos um efeito do género que pode estar relacionado com a administração de tamoxifeno. Quer no caso dos animais Cre⁺ quer no caso dos animais

Cre⁻, as fêmeas desenvolveram menos metástases do que os machos. Além disso, as fêmeas Cre⁻ apresentaram menos metástases do que as fêmeas C57BL/6 *WT*, sugerindo por isso um efeito do tamoxifeno especificamente nas fêmeas. Uma vez que o tamoxifeno foi administrado antes da inoculação endovenosa das células B16-F10, este efeito deverá estar relacionado com o condicionamento do nicho pré-metastático.

Os efeitos mediados por hormonas no crescimento tumoral, foram revelados inicialmente através das suas ações em células neoplásicas responsivas a hormonas; contudo, foi demonstrado recentemente que células positivas para recetores de estrogénio (ER – *Estrogen Receptor*) presentes no estroma tumoral, têm capacidade para estimular a angiogénese e promover o crescimento tumoral em resposta ao estrogénio mesmo quando as células neoplásicas são ER-negativas (P. B. Gupta et al., 2007; Watnick, 2012). Além disso, o estrogénio tem capacidade reprimir a expressão de Tsp-1 (Colombel et al., 2005; Sengupta, Banerjee, Saxena, & Banerjee, 2004) e a expressão de VEGF pode ser induzida por hormonas sexuais (Robert S Kerbel, 2008), duas observações que levaram a considerar a privação de hormonas como uma terapia anti-angiogénica indireta (Hansen-Algenstaedt et al., 2000; R K Jain et al., 1998).

O tamoxifeno é um inibidor seletivo dos recetores de estrogénio usado no tratamento adjuvante e neoadjuvante do cancro da mama positivo para recetores de estrogénio (ER+). O seu mecanismo de ação consiste na inibição competitiva da sinalização pelo estrogénio endógeno (Anda-Jáuregui, Mejía-Pedroza, Espinal-Enríquez, & Hernández-Lemus, 2015).

Nos murganhos transgénicos usados neste trabalho (*Dll4^{lox/wt}-VE-Cadherin-Cre-ER^{T2}*), o tamoxifeno administrado além de se ligar ao recetor de estrogénio nas células endoteliais (e ativar nestas a recombinase Cre) pode ligar-se a recetores de estrogénio endógenos presentes noutros tipos celulares do nicho pré-metastático e neles modificar vias de sinalização reguladas pelo estrogénio, como as que estão envolvidas na promoção da angiogénese.

Uma vez que o tamoxifeno é administrado antes da inoculação das células B16-F10, mesmo que estas células tenham recetores de estrogénio, não devemos ter qualquer efeito do tamoxifeno sobre estas, mas sim sobre o nicho metastático, o pulmão.

O efeito observado especificamente nas fêmeas poderá estar relacionado com uma expressão diferencial de recetores de estrogénio no pulmão e/ou com a maior concentração sanguínea de estrogénio endógeno.

O estrogénio tem um importante papel na morfogénese do pulmão sobretudo através da sua ligação aos ER-β cuja expressão é muito abundante no parênquima pulmonar adulto (Morani et al., 2006). O estrogénio é responsável por estimular o início da produção de surfactante pulmonar e influencia o tamanho e número de alvéolos pulmonares. Nos mamíferos verifica-se

um dimorfismo sexual na maturação do pulmão (Ballard, 1989; Mendelson & Boggaram, 1990).

Sabe-se por exemplo que o estrogénio ativa a via MAPK (Migliaccio et al., 1996; Razandi, Pedram, Park, & Levin, 2003; Robert X.-D. Song, Zhang, Chen, Bao, & Santen, 2007; Robert X-D Song et al., 2002) e que num modelo de metastização experimental com células ELT3 (*Eker rat uterine Leiomyoma-derived smooth muscle cells*) nulas para TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*), a administração de estrogénio promove a sobrevivência destas células neoplásicas em circulação e a colonização do pulmão (J. J. Yu et al., 2009).

Assim, a administração de tamoxifeno, que inibe a sinalização pelo estrogénio endógeno no pulmão, pode resultar na menor colonização deste nicho metastático, um efeito que se espera ser mais acentuado nas fêmeas por terem maior concentração desta hormona.

Tendo em conta a necessidade de identificar novos alvos da terapia oncológica anti-angiogénica, e os dados preliminares já referidos, o terceiro trabalho experimental teve como objetivo a produção de uma linha de murganhos com perda de função condicional e induzível de Tspan18.

O primeiro passo crucial para a modificação das CEEs é a eletroporação. Na primeira sessão de eletroporação testámos 3 quantidades diferentes de ADN vetor (à mesma concentração 1 µg/µL), de modo a tentar descobrir os valores ideais para este protocolo. Obtivemos mais clones (em média 56 por cuvete ou placa) com integração estável do vetor quando usámos 20 µL (ou cerca de 20 µg) de ADN vetor o que nos levou a adotar esta quantidade nas sessões seguintes. A esta concentração (1 µg/µL) o volume de ADN adicionado à mistura de eletroporação, não parece ser o fator limitante para a eficiência de transfeção, uma vez que com quantidades menores (10 µL ou aproximadamente 10 µg) tivemos uma redução de 37,5%, e com quantidades maiores (30 µL ou aproximadamente 30 µg) obtivemos também uma redução de 42,9% de clones picados após a seleção positiva-negativa. Este resultado permite-nos concluir que a purificação por extração com fenol-clorofórmio do ADN vetor linearizado, não conduziu à presença de elementos nocivos às CEEs na solução final de ADN uma vez que quer volumes menores, quer volumes maiores, da solução de ADN vetor conduziram à recuperação de menos clones de CEEs resistentes.

Como após a primeira sessão de eletroporação, em que as células de cada cuvete foram passadas para apenas uma placa de 100 mm, verificámos que no final do processo de seleção muitas das colónias de CEEs se encontravam já diferenciadas apesar de ainda serem pequenas, nas sessões seguintes decidimos passar as células eletroporadas em menor densidade, distribuindo-as por duas ou três placas de 100 mm. Esta alteração no protocolo, apesar de ter conduzido a uma redução de 32,9% e de 57,2% no número de colónias picadas por cuvete na segunda e terceira

sessão, respetivamente, (por comparação com cuvetes em que se usou a mesma quantidade de ADN vetor na primeira sessão), permitiu a obtenção de colónias de CEEs menos diferenciadas e de tamanho mais homogéneo após 8 dias de seleção positiva-negativa. Note-se que na terceira sessão, foram usadas menos CEEs em cada mistura de eletroporação, o que conduziu naturalmente a um menor número médio de colónias picadas por cuvette, por outro lado, verificou-se que o aumento do *ratio* ADN vetor/célula na mistura de eletroporação não trouxe qualquer benefício adicional em termos de número de clones resistentes recuperados.

No seguimento do protocolo de seleção positiva-negativa (crescimento em meio de cultura suplementado com G418 e Ganciclovir) a ocorrência de recombinação homóloga com o ADN vetor no local correto do ADN genómico dos clones de CEEs resistentes, foi avaliada realizando duas reações em cadeia da polimerase, usando como molde ADN extraído dos clones de CEEs repicados. No processo de extração de ADN, verificámos alguma variabilidade entre as 3 sessões, conseguindo recuperar ADN de 46% das colónias resistentes na 1ª sessão, de 25% na 2ª sessão e de 100% na 3ª sessão. Tal variabilidade pode ser explicada quer pela perícia dos operadores para determinar o melhor momento para realizar a extração de ADN quer por diferentes taxas de crescimento dos clones resistentes obtidos em cada sessão. O fato de não se ter conseguido extrair ADN de todos os clones resistentes também conduziu a uma diminuição do número de clones possíveis de rastrear para a ocorrência de recombinação homóloga com o ADN vetor.

Neste trabalho experimental, o PCR revelou-se uma técnica bastante eficaz, simples e rápida para a deteção dos clones de células embrionárias estaminais recombinantes homólogos.

As reações de PCR desenhadas revelaram que a segunda e terceira repetições do protocolo de eletroporação foram mais eficientes. Considerando apenas os clones resistentes dos quais foi possível extrair ADN genómico, foi detetado apenas 1 clone recombinante em 155 na primeira sessão, 3 em 47 na segunda sessão e 3 em 96 na terceira sessão.

Depois de se terem identificado os clones recombinantes homólogos, sete no total, dos quais só conseguimos expandir e criopreservar cinco, avançou-se para o protocolo de agregações diplóides. Fizeram-se vinte e três réplicas deste protocolo. Para as agregações diplóides, é fundamental a obtenção de embriões no estágio de mórula de oito células e para tal, realiza-se a superovulação das fêmeas dadoras. Este protocolo hormonal tem duas funções, primeiro sincronizar o ciclo éstrico das fêmeas para que a maioria esteja na fase de estro e segundo, aumentar o número de embriões para recolha. Todas as fêmeas seguiram o mesmo protocolo de superovulação nas vinte e três réplicas. A eficiência de sincronização e indução de ovulação variou entre 34,7% e 68,3% para a estirpe CD-1 antiga, 63,2% e 80,5% para a estirpe NMRI e 39,2% e 54,2% para a estirpe CD-1 nova. Analisando as experiências em que se usaram cada

uma das estirpes como uma só, estes resultados representam um aumento médio de $2,1\times$, $2,9\times$ e $1,9\times$ no número de fêmeas com rolhão vaginal, para a estirpe CD-1 antiga, NMRI e CD-1 nova, respetivamente, em relação aos valores esperados em fêmeas não superovuladas (25%). Estas diferenças revelaram-se estatisticamente significativas entre a estirpe NMRI e a estirpe CD-1, sendo assim possível que, no que diz respeito à capacidade de resposta ao tratamento hormonal para sincronização do ciclo éstrico e indução da ovulação, esta seja uma estirpe mais responsiva. Contudo, uma fêmea superovulada pode apresentar um rolhão vaginal após ter passado uma noite com um macho, mas não ficar gestante; nesses casos, em que não é possível recolher embriões em fase de pré-implantação por lavagem dos ovidutos, ou o protocolo hormonal não foi eficaz na indução da ovulação (e não encontramos sequer oócitos) ou a superovulação funcionou (e encontramos muitos oócitos não fecundados) mas houve algum problema na fecundação. De todas as fêmeas superovuladas com rolhão vaginal verificámos que 64,8% da estirpe CD-1 antiga, 79,8% da estirpe NMRI e 73,8% da estirpe CD-1 nova ficaram gestantes, diferenças que não se revelaram estatisticamente significativas. Assim, parece que o que determina que uma fêmea superovulada fique gestante ou não, não está relacionado com a estirpe. Fatores relacionados com a fertilidade do macho e da fêmea, fatores ambientais e também sociais, podem influenciar a fecundação. No que diz respeito a fatores sociais, a presença de um rolhão vaginal nem sempre significa que a fêmea estava em estro na noite que esteve com o macho; está descrito que fêmeas submissas podem permitir a cópula, ou, por outro lado, alguns machos, muito agressivos podem “violar” fêmeas que não são submissas.

Em relação ao número de embriões recolhidos a partir destas fêmeas, obteve-se, em média, 13 (4) embriões no caso da estirpe CD-1 antiga, 29 (6) embriões no caso da estirpe NMRI e 31 (4) embriões no caso da estirpe CD-1 nova, existindo diferenças estatisticamente significativas entre a estirpe CD-1 antiga e a estirpe NMRI e entre a estirpe CD-1 antiga e a estirpe CD-1 nova. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a estirpe NMRI e CD-1 nova. As variações obtidas entre as vinte e três repetições deste método podem ser resultado de variações quer nas próprias fêmeas de cada estirpe, entre estirpes e também na perícia do operador para realizar a lavagem dos ovidutos. O melhor desempenho das fêmeas NMRI e das fêmeas CD-1 novas pode simplesmente estar relacionado com o fato de estas duas últimas terem sido adquiridas no decorrer dos ensaios e sido usadas logo após o período de quarentena, não refletindo assim o estado hígio-sanitário do biotério. O pior desempenho das fêmeas CD-1 antigas possivelmente não se deve ao fato de serem da estirpe CD-1, mas sim por pertencerem a uma população de murganhos resultante de múltiplas gerações criadas no nosso biotério. Infecções virais, bacterianas ou parasitárias subclínicas podem determinar uma diminuição da

fertilidade. A diminuição da fertilidade está descrita para doenças virais como a causada por *Minute virus mice*, para doenças bacterianas como a causada por *Mycoplasma pulmonis* ou *Salmonella enteritidis* ou ainda para doenças parasitárias, como a toxoplasmose por *Toxoplasma gondii*.

Os embriões recolhidos foram agregados com as CEEs recombinantes homólogas. Verificámos que, independentemente da estirpe dadora de embriões (mórulas de oito células), quer o total de embriões viáveis resultantes da agregação, quer a proporção de blastocistos obtidos do total desses embriões viáveis, registaram uma evolução tendencialmente positiva ao longo das 23 sessões de agregação. A elevada variabilidade observada quer num parâmetro, quer no outro (com 50% de embriões viáveis na 6ª sessão a 98% de embriões viáveis na 22ª sessão e nenhum blastocisto na 9ª e 10ª sessão a 100% de blastocistos na 16ª e 22ª sessão) levou-nos a realizar uma análise tendo em conta a estirpe do embrião e o clone de CEEs usado na agregação. Em termos de proporção de embriões viáveis (resultantes da agregação) do total de embriões distribuídos pelas placas de agregação, a estirpe CD-1 nova foi a que nos permitiu obter resultados significativamente melhores (97,5% (2,5%)) em comparação com a estirpe CD-1 antiga (72,5% (12,4%)) e NMRI (77% (11,2%)). Estas duas últimas estirpes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. Em termos de proporção de blastocistos do total de embriões viáveis, estas diferenças foram ainda mais significativas, tendo sido obtidos mais blastocistos a partir de embriões da estirpe CD-1 nova (80,2% (16,3%)) do que com embriões da estirpe NMRI (58,6% (35,9%)) ou CD-1 antiga (13,2% (5,4%)). Ao contrário do verificado quando temos em conta todos os embriões viáveis, a estirpe NMRI apresentou diferenças estatisticamente significativas relativamente à estirpe CD-1 antiga. Este resultado pode dever-se à ordem por que usámos os embriões de cada estirpe e não ter a ver necessariamente com a estirpe de murganho. Com o aumento das repetições do procedimento aumentou também a perícia dos operadores para seleccionar os melhores embriões de oito células para distribuir pela placa de agregação; a quantidade de blastocistos de agregação obtidos é determinada sobretudo pela qualidade e estado de desenvolvimento das mórulas.

Analisando a agregação por clone de CEEs usado, verificámos que houve sempre uma grande variabilidade; note-se que é difícil tirar conclusões desta análise uma vez que o número de sessões em que usámos cada um deles foi bastante diferente. No entanto, parece que o clone de CEEs não teve grande influência no sucesso da agregação.

Após o procedimento de agregação, os embriões foram transferidos para fêmeas pseudogestantes. A obtenção de fêmeas pseudogestantes baseia-se no fato de as fêmeas de ratinho assumirem um padrão hormonal de gestantes após a ocorrência de cópula durante o estro, independentemente da ocorrência de fecundação. Para tal cruzam-se fêmeas com machos

vasectomizados. A taxa de indução de ovulação nas vinte e três repetições da experiência variou entre 2,4% na 22ª experiência e 32,7% na 6ª experiência. Analisando todas as sessões em que se usou cada uma das estirpes como uma só experiência obteve-se, em média, 16,5% para a estirpe CD-1 antiga, 12,3% para a estirpe NMRI e 13,3% para a estirpe CD-1 nova, de sincronização do ciclo éstrico e indução de ovulação na fase de estro no dia de cruzamento. A média das 23 sessões foi de 14%. Como estas fêmeas não são superovuladas este resultado indica que na realidade, sem tratamento hormonal, uma grande parte das fêmeas não se encontrará a ciclar. Entre as razões para não se obterem os potenciais 25% de sincronização, encontram-se fatores ambientais e o estado hígio-sanitário dos animais. Considerando o valor médio de 14% como o valor base de taxa de sincronização do ciclo éstrico e indução de ovulação em fêmeas sem tratamento hormonal, o valor médio global de 56,7% obtido com as fêmeas superovuladas representa um aumento real de 405% (ou $4,05\times$ mais) em relação ao valor basal de sincronização do ciclo éstrico e indução de ovulação. Este valor de variação também pode ser afetado pela diferença de pesos das fêmeas usadas, sendo que nos cruzamentos com machos vasectomizados se usaram fêmeas com mais de 30 g e nos cruzamentos em que se superovularam as fêmeas estas tinham entre 20 a 22 g. Apesar de parecer uma pequena variação de pesos, está descrito que fêmeas mais pesadas e mais velhas, mais dificilmente são cobertas por machos agressivos quando não estão em estro. Assim, quando se observa um rolhão vaginal nestas fêmeas, regra geral elas estão mesmo pseudogestantes pois têm de estar em estro (recetivas) para permitir a cópula.

Relativamente à transferência dos embriões resultantes da agregação das mórulas com as CEEs recombinantes, podemos verificar que as fêmeas da estirpe CD-1 nova foram as melhores recetoras, com uma taxa média de gestação de 73,3% (das 15 fêmeas usadas, 11 ficaram gestantes), seguidas das NMRI com uma taxa média de gestação de 37% (das 27 fêmeas usadas, 10 ficaram gestantes) e por fim, as que tiveram pior desempenho foram as CD-1 antigas, com uma taxa média de gestação de 16,7% (das 30 fêmeas usadas, 5 ficaram gestantes). Contudo, a estirpe de fêmea recetora pode não ter sido o principal fator a afetar o sucesso das transferências, uma vez que além de termos mudado de estirpe mudámos também de técnica de transferência. Assim, da primeira à oitava sessão usámos como fêmeas CD-1 antigas como recetoras e a transferência uterina foi unilateral e realizada numa altura do dia em que a maior parte dos embriões resultantes da agregação ainda não se encontrava na fase de blastocisto. Como nestas oito primeiras sessões o sucesso das transferências se revelou muito baixo, foi decido mudar de estirpe dadora e adquirimos fêmeas NMRI. Tal como já foi referido, esta estirpe respondeu muito bem ao protocolo de superovulação. Dada a maior disponibilidade de embriões, mudámos a técnica de transferência uterina de unilateral para bilateral, mas na 9ª e 10ª sessão,

ainda usámos como recetoras as fêmeas CD-1 antigas. Como apesar de estarmos a transferir mais embriões, continuávamos a ter uma baixa taxa de sucesso, levantou-se a hipótese de poder existir algum tipo de incompatibilidade entre embriões da estirpe NMRI e o ambiente uterino de fêmeas da estirpe CD-1; assim, a partir da 11ª e até à 18ª usámos embriões NMRI e fêmeas recetoras NMRI, mantendo a técnica de transferência bilateral, tendo sido realizada transferência unilateral na 12ª e 13ª sessões devido a uma menor disponibilidade de embriões. Como continuávamos com taxas de sucesso (fêmeas gestantes do total de fêmeas recetoras usadas) inferiores a 50%, foi decidido mudar novamente de estirpe dadora e recetora e adquirimos fêmeas da estirpe CD-1 ao repositório da Harlan Ibérica. Ao mesmo tempo mudou-se o horário das transferências de modo a estas serem realizadas numa altura em que tínhamos maioritariamente (mais de 80%) blastocistos resultantes da agregação. Com esta mudança de horário foi também necessário mudar de operador, mantendo-se, contudo, a técnica bilateral. Estas alterações fizeram-nos perceber que o atraso no desenvolvimento embrionário, desencadeado pela manipulação e pela cultura *in vitro* era superior ao esperado. Assim, verificamos que, em vez das 24 horas descritas na literatura (Andras Nagy & Rossant, 2000), eram necessárias 28 a 30 horas para termos a maior parte dos embriões na fase de blastocisto. Inicialmente, não demos tanta importância ao fato de os embriões ainda não estarem com este estágio de desenvolvimento e preocupamo-nos mais com o desfasamento relativamente ao tempo de pseudogestação, que sabíamos ter de ser inferior aos dos embriões (Hogan, Beddington, Costantini, et al., 1994b). Contudo, depois de 17 sessões em que transferíamos maioritariamente embriões em fase de mórula compacta e termos verificado que muitas das fêmeas recetoras não ficavam gestantes, decidimos que seria melhor comprometer um pouco esse desfasamento e apostar em transferir blastocistos. O aumento significativo de fêmeas gestantes por sessão de transferência a partir da 18ª sessão leva-nos a concluir que o sucesso da transferência é determinado sobretudo pela coincidência entre a fase de desenvolvimento embrionário e de pseudogestação, não sendo necessário um desfasamento tão grande como o descrito na literatura (Hogan, Beddington, Costantini, et al., 1994b), sendo assim mais vantajoso transferir maioritariamente blastocistos.

As fêmeas recetoras da estirpe CD-1 nova proporcionaram-nos 23,9% (11/46) de animais quiméricos, as da estirpe NMRI 13,6% (3/22) e as da estirpe CD-1 antiga deram à luz 9 animais, mas nenhum era quimérico. A capacidade de implantação dos embriões transferidos, pode ser influenciada pela estirpe de murganho usada, contudo as estirpes usadas estão descritas como tendo um desempenho reprodutivo excecional. Uma vez que a utilização das fêmeas da estirpe CD-1 nova coincidiu com a alteração da técnica de transferência uterina acreditamos que neste caso, a técnica teve mais influência do que a estirpe na frequência das quimeras nascidas. Note-

se que o estado hígio-sanitário e o ambiente em que as fêmeas são mantidas é igualmente importante para a sua fertilidade e de fato, as fêmeas que passaram menos tempo no nosso biotério (as da estirpe NMRI e CD-1 nova) foram as que tiveram melhor desempenho quer como dadoras quer como recetoras.

Usaram-se cinco clones diferentes de CEEs recombinantes homólogos: 3.1A, 1.2E, 1.3E, 1.11C, 1.12B. O clone 1.3E foi usado em apenas uma sessão e não foi possível obter quimeras deste clone. Nas vinte e três sessões de agregação obtivemos um total de catorze quimeras: uma que resultou da agregação clone 3.1A a um embrião da estirpe CD-1 nova, uma que resultou da agregação do clone 1.2E a um embrião da estirpe NMRI, seis que resultaram da agregação do clone 1.11C a embriões da estirpe CD-1 nova e as outras seis resultaram da agregação do clone 1.12B a embriões da estirpe CD-1 nova, contudo entre estas seis, duas delas morreram nos primeiros três dias de vida. A frequência de quimeras obtidas por clone de CEEs, para os casos em que nasceram quimeras, foi de 4,2% para o clone 3.1A, 7,7% para o clone 1.2E, 26,1% para o clone 1.12B e 37,5% para o clone 1.11C. Note-se que, as 12 quimeras que sobreviveram, foram obtidas em apenas 4 (18ª a 21ª) das 23 sessões realizadas tendo coincidido com a altura em que mudámos o horário das transferências para depois das 6 da tarde. Por outro lado, em 3 dessas 4 sessões foram usados embriões da estirpe CD-1 nova, o que nos leva a concluir que o clone de CEEs usado não está entre os principais fatores que influenciaram a sobrevivência dos animais de si derivados.

Como as CEEs da linha R1 têm um complemento genético correspondente ao sexo masculino existe sempre uma tendência para o sexo masculino nas quimeras. Usando CEEs masculinas é difícil obter quimeras femininas e tal acontece apenas em casos em que as CEEs tiveram uma contribuição baixa para o desenvolvimento do animal e o embrião recetor era XX, ou em casos em que o animal apenas aparenta ser feminino, sendo antes hermafrodita. Os nossos resultados confirmam esta observação; em doze quimeras que chegaram a adultos, sete eram machos, contudo, entre as cinco quimeras mais fortes (a # 8, 9, 10, 11 e 12, com contribuição na pelagem superior a 40%) que obtivemos, três eram machos e duas eram fêmeas (uma das fêmeas não sobreviveu até à idade adulta). Entre as sete quimeras mais fracas (com contribuição na pelagem inferior a 30%), quatro eram machos e três eram fêmeas. O fato de as quatro quimeras fêmea que chegaram à idade adulta (uma forte e três fracas) serem férteis, indica que não eram hermafroditas.

A obtenção de animais quiméricos é apenas o primeiro passo para o estabelecimento de uma linha de animais transgênicos. Para se estabelecer uma linha transgênica é necessário que as CEEs transgênicas contribuam para a formação da linha germinal da quimera, só nesse caso é que a descendência das quimeras vai possuir o transgene.

As quimeras obtidas foram cruzadas com animais CD-1, machos ou fêmeas consoante o caso, e obtiveram-se crias com pelagem *agouti* descendentes das quimeras # 8, 9, e 12, que correspondem a três das seis quimeras derivadas do clone de CEEs 1.11C. Curiosamente, a quimera # 12, uma fêmea, demonstrou contribuição das CEEs à linha germinal, tendo dado origem a 5 crias *agouti* em duas ninhadas. Este fato anormal, devido ao sexo das CEEs, pode ter representado um evento isolado de perda do cromossoma Y, dando origem a uma contribuição das CEEs com genótipo XO para a linha germinal, que consegue percorrer os passos da oogénese, ao contrário da linhagem XY que normalmente não consegue tal diferenciação. Inesperadamente, a quimera macho # 11 apesar de fértil e de ser uma das quimeras mais fortes, não transmitiu a mutação à descendência.

Uma vez que a descendência F1 *agouti* tem 50% de hipótese de ser transgénica, foi realizada uma reação de PCR usando como molde ADN extraído de uma biópsia de cauda destes animais, para detetar a presença de pelo menos uma das mutações introduzidas. A primeira reação de PCR foi desenhada para detetar a presença do gene *NeoR*, um gene procariota, introduzido com o vetor Tsp18cKO que funcionou como marcador da integração no genoma, por seleção positiva. Estes animais foram ainda confirmados para a integração do vetor no genoma por recombinação homóloga realizando uma das reações de PCR usada para selecionar os clones de CEEs. Esta pareceu-nos a estratégia mais adequada para selecionar os primeiros descendentes *agouti* F1 que seriam então os fundadores das três linhagens que pretendíamos obter: Tsp18^{lox/lox}, Tsp18^{lox/lox}-*VE-Cad-Cre-ERT²* e Tsp18^{lox/lox}-*CAGG-Cre-ERTM*. Não foi confirmada a presença das outras mutações no ADN genómico destes primeiros descendentes F1 por já se ter confirmado que estavam no vetor Tsp18cKO quer por restrições de diagnóstico, quer por sequenciação, além de se ter confirmado a funcionalidade dos locais *loxP* por transformação de células competentes que expressam a recombinase Cre.

Na geração F2 o objetivo foi selecionar tanto animais homozigóticos como heterozigóticos. Para tal foi desenhada uma nova reação em cadeia da polimerase (Tsp18F2) que nos permitia saber se cada animal tinha só o alelo *WT* ou o alelo *WT* e o mutante (*lox*), servindo o alelo *WT* como controlo interno da reação. Contudo, como nesta geração não tínhamos por objetivo selecionar exclusivamente animais homozigóticos para a mutação, não houve o cuidado de desenhar uma reação que permitisse essa distinção nesta fase, ou seja, poderíamos ter continuado com a reação que detetava apenas o gene *NeoR* sem, contudo, ter um controlo interno da reação, ou seja, teríamos só um resultado de presença ou ausência de produto.

Assim, na geração F3, com o objetivo de selecionar exclusivamente animais homozigóticos (Tsp18^{lox/lox}), foi necessário desenhar uma nova estratégia de PCR. Mantendo a utilização de três oligonucleótidos iniciadores, esta nova reação (Tsp18HOMO) conduzia à produção de um

produto correspondente ao alelo mutante e de um produto correspondente ao alelo *WT*, contudo, para que um terceiro produto possível de amplificar em animais com o alelo mutante não surgisse, foi necessário otimizar as condições da reação. A dada altura, um dos oligonucleótidos iniciadores esgotou-se e o novo lote adquirido nunca funcionou. Assim, aproveitou-se esta oportunidade para desenhar uma nova reação de PCR, que não necessitasse de tanta otimização e que fosse mais robusta. Selecionamos a região do genoma correspondente ao local de integração do primeiro *loxP*, isto é, o intrão 3 do gene *tspan18*, desenhando um oligonucleótido iniciador direto que hibrida a montante e um oligonucleótido iniciador inverso que hibrida a jusante (Tsp18loxI3). Deste modo, a diferença entre o alelo mutante e o alelo *WT* corresponderia exatamente ao tamanho da sequência *loxP* (aproximadamente 43 pb). Na primeira reação teste realizada usando como molde ADN dos clones de CEEs que deram origem a quimeras, verificámos tínhamos amplificação dos dois produtos correspondentes ao alelo *WT* e mutante no clone 1.12B, um clone que deu origem a quimeras mais fracas sem transmissão à descendência. O clone 1.11C, que deu origem às quimeras mais fortes e com transmissão à descendência, apenas permitiu a amplificação do fragmento correspondente ao alelo *WT*, ou seja, não tinha a 1ª sequência *loxP* na localização prevista. Este resultado levou-nos a tentar perceber se neste clone de CEEs em particular, o 1º local *loxP* não teria sido integrado noutra região do braço de homologia 5'. Assim, amplificámos por PCR todo o braço de homologia, e enviámos diretamente para sequenciação; contudo, não foi possível ficar com a sequência completa por o produto enviado se ter degradado. A clonagem de um produto de PCR em pGEM-T *easy* aumenta a sua estabilidade, permitindo assim a sua sequenciação completa. Como o braço de homologia 5' é muito extenso (cerca de 5 Kb) a sua clonagem em pGEM-T *easy* em apenas um passo é tecnicamente difícil; assim, decidimos dividir a região do braço de homologia 5' em duas partes que seriam clonadas separadamente. Para tal desenhamos duas reações de PCR, uma que permitisse a amplificação da região a montante e uma que permitisse a amplificação da região a jusante da localização prevista do primeiro *loxP*. Dada a limitação de tempo para concluir os trabalhos de doutoramento, apenas foi possível clonar e sequenciar a região a jusante, tendo-se concluído que o local *loxP* que deveria estar no intrão 3 não estava em mais local nenhum do braço de homologia 5' quer de um animal F3 homozigótico (pela reação de PCR Tsp18HOMO), quer do clone de CEEs 1.11C que deu origem às quimeras fundadoras, estando, contudo, presente na localização prevista no braço de homologia 5' do clone de CEEs 1.12B. Este resultado leva-nos a concluir que terá ocorrido algum evento recombinatório aleatório que conduziu à perda do 1º *loxP*. Sendo uma sequência palindrômica, pode formar estruturas em gancho (*hairpin*); neste cenário, a ADN polimerase “salta” esta sequência durante a replicação do ADN ou, os mecanismos de correção do ADN conduzem à

sua excisão. Outros fenômenos aleatórios, como uma translocação ou um *crossing-over* desigual podem também explicar a ausência desta sequência.

Não existindo este primeiro local *loxP*, a administração de tamoxifeno aos duplos mutantes (Tsp18^{lox/lox}-*VE-Cad-Cre-ER^{T2}* e Tsp18^{lox/lox}-*CAGG-Cre-ERTM*) não iria conduzir à deleção do codão ATG e de parte do exão 4 do gene *tspan18*, uma condição essencial para cumprir o principal objetivo deste trabalho experimental, o estudo do fenótipo resultante da perda do produto deste gene, a tetraspanin 18.

Assim, os trabalhos foram interrompidos e os animais até aí obtidos foram sacrificados.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Apesar de a terapia oncológica anti-angiogénica ter um comprovado benefício clínico, continua por esclarecer o efeito deste tipo de abordagem terapêutica em diferentes contextos clínicos e na metastização.

No caso das terapias anti-VEGF, têm surgido casos de desenvolvimento de resistência e outros em que não existe sensibilidade; relativamente à metastização existem observações contraditórias, com alguns autores a afirmarem um aumento e outros a salientar um efeito preventivo deste processo. O fato dos mecanismos moleculares subjacentes às diferentes etapas da metastização só agora começarem a ser melhor compreendidos, e por outro lado, a escassez de modelos de metastização adequados, também não beneficia o esclarecimento desta questão.

A terapia anti-Dll4 tem-se revelado uma abordagem terapêutica antitumoral promissora.

Além de funcionar em casos de tumores resistentes à terapia com anti-VEGF, parece que a sinalização Dll4/Notch está implicada nesse mecanismo de resistência, pelo que, a associação destas duas terapêuticas anti-angiogénicas terá vantagens.

Apesar de já se saber como é que as terapias anti-Dll4 funcionam na neo-angiogénese fisiológica e patológica, ainda muito se desconhece sobre como é que estas terapias funcionam em contextos mais semelhantes aos perfis terapêuticos comumente utilizados em humanos. Pouco se sabe sobre qual o momento mais apropriado para administrar estas terapias, ou sobre o seu efeito em combinação com fármacos quimioterapêuticos habitualmente usados, um cenário mais comum nos protocolos terapêuticos oncológicos humanos. Além disso, ainda se desconhece o efeito da terapia anti-Dll4 no processo metastático.

A utilização do modelo TRAMP permitiu-nos obter novos conhecimentos sobre algumas destas questões, ao demonstrar que a monoterapia com sDll4Fc é mais eficiente quando a densidade microvascular e os níveis de VEGF são mais elevados e que a administração combinada acaba por melhorar a eficácia terapêutica do citostático doxorrubicina, por aumentar a disponibilidade e a acumulação deste fármaco no tumor e, conseqüentemente, potenciar o aumento da população de células da linha granulocítica/monocítica que atuam como mediadoras da função da doxorrubicina .

Uma vez que níveis elevados do VEGF em circulação e a elevada densidade microvascular tumoral são considerados maus indicadores de prognóstico no cancro da próstata em que, os atuais fármacos anti-VEGF apresentam eficácia limitada e elevados níveis de resistência, à luz dos resultados obtidos neste trabalho, propomos que o sDll4Fc possa representar uma boa alternativa terapêutica nas situações em que se desenvolve resistência e que, pelo menos, deva ser considerado como uma alternativa aos fármacos anti-VEGF por oferecer benefícios maiores

e mais variados, especialmente quando administrado em combinação com os fármacos quimioterápicos comuns, permitindo assim uma melhoria nos atuais protocolos terapêuticos para o cancro prostático.

Uma das razões que nos levou a escolher os murganhos TRAMP como modelo tumoral para estudo, foi o fato de estar descrito que nestes animais existe disseminação tumoral hematógena e linfática a partir das 12 semanas de idade e que às 24-30 semanas de idade, 100% dos animais apresenta focos metastáticos nos pulmões, linfonodos peri-aórticos, linfonodos pélvicos, tecido ósseo ou fígado. Tal característica, permitir-nos-ia avaliar o potencial dos protocolos terapêuticos testados para evitar ou reduzir a disseminação metastática num contexto em que é possível estudar todas as etapas do processo de metastização.

Contudo, nos nossos animais experimentais, nunca conseguimos detetar macroscopicamente focos metastáticos em qualquer uma das localizações descritas. Tal ausência pode dever-se a inúmeros factores, desde limitações na técnica de deteção das metástases, factores ambientais e estado imunológico da nossa colónia de murganhos TRAMP, até simplesmente o tempo necessário para que estes animais desenvolvam focos metastáticos visíveis a olho nu.

Uma vez que consideramos de uma importância fulcral testar o efeito da sinalização Dll4/Notch no processo metastático, decidimos que o próximo trabalho experimental deveria consistir no estabelecimento de um modelo de metastização fiável e reprodutível.

As dificuldades encontradas nos diferentes modelos de metastização espontânea ensaiados, levaram-nos a utilizar um modelo de metastização experimental com células de melanoma murino B16-F10 amplamente utilizado por diversos autores.

A realização deste modelo em murganhos heterozigóticos para Dll4 a nível do endotélio vascular permitiu-nos verificar que, a diminuição da sinalização Dll4/Notch neste tipo celular leva ao desenvolvimento de menos macrometástases pulmonares do que murganhos com um nível de sinalização normal. Além disso, verificámos ainda a existência de um efeito do tamoxifeno apenas no género feminino e independente do nível de sinalização Dll4/Notch, em que as fêmeas apresentam em média menos metástases do que os machos. Este efeito poderá estar relacionado com a sinalização por estrogénios endógenos no condicionamento do nicho pré-metastático.

Uma vez que a sinalização Dll4/Notch desempenha importantes funções em vários tipos celulares, será importante numa fase posterior realizar este mesmo modelo de metastização experimental para testar o efeito da redução generalizada da sinalização Dll4/Notch com a terapia anti-Dll4 (quer com anticorpos quer com a molécula sDll4Fc), que poderá ter um efeito diferente da redução especificamente no endotélio.

Considerando que existe uma necessidade de identificar novos alvos da terapia oncológica anti-angiogénica e que, muitas das vias de sinalização envolvidas na angiogénese fisiológica participam também na angiogénese tumoral, dados não publicados fornecidos por um laboratório colaborador, levaram-nos a iniciar a produção de uma nova linha de murganhos com perda-de-função condicional e induzível da Tetraspanin18. Após termos obtido quimeras fundadoras e termos iniciado os cruzamentos com as linhas transgénicas para o estabelecimento de linhas com perda-de-função ubíqua ou endotelial específica, a ocorrência de um evento recombinatório aleatório ou de outros fenómenos aleatórios, como uma translocação ou um *crossing-over*, parece ter conduzido à perda da sequência *loxP* localizada a montante do codão de iniciação de *tspan18*. Não existindo este local *loxP*, a administração de tamoxifeno aos duplos mutantes (*Tsp18^{lox/lox}-VE-Cad-Cre-ER^{T2}* e *Tsp18^{lox/lox}-CAGG-Cre-ERTM*) não iria conduzir à deleção genética prevista, uma condição essencial para cumprir o principal objetivo deste trabalho experimental, o estudo do fenótipo resultante da perda do produto deste gene, a Tspan18. Este resultado, inesperado, leva-nos a concluir que apesar de terem sido dados todos os passos necessários para o estabelecimento de uma nova população de murganhos mutantes, podem ocorrer eventos aleatórios que anulam todos os esforços. De modo a que uma situação destas não volte a acontecer, apenas nos resta recomendar que seja confirmada por sequenciação, a correta integração de cada uma das mutações necessárias no ADN genómico dos primeiros descendentes F1 fundadores.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, M., Sugiura, T., Takahashi, M., Ishii, K., Shimoda, M., & Shirasuna, K. (2008). A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of cancer cells. *Cancer Letters*, 266(2), 163–170. doi:10.1016/j.canlet.2008.02.058
- Adachi, M., Taki, T., Ieki, Y., Huang, C. L., Higashiyama, M., & Miyake, M. (1996). Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 56(8), 1751–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620488>
- Adams, J. M., & Cory, S. (1991). Transgenic models of tumor development. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5035), 1161–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1957168>
- Adams, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(6), 464–78. doi:10.1038/nrm2183
- Adini, A., Kornaga, T., Firoozbakht, F., & Benjamin, L. E. (2002). Placental Growth Factor Is a Survival Factor for Tumor Endothelial Cells and Macrophages. *Cancer Res.*, 62(10), 2749–2752. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/62/10/2749.long>
- Ainsworth, N. L., Lee, J. S., & Eisen, T. (2009). Impact of anti-angiogenic treatments on metastatic renal cell carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 9(12), 1793–805. doi:10.1586/era.09.144
- Akiyama, Y., Watanabe, M., Maruyama, K., Ruscetti, F. W., Wiltrout, R. H., & Yamaguchi, K. (2000). Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. *Gene Therapy*, 7(24), 2113–21. doi:10.1038/sj.gt.3301353
- Alani, R. M., Silverthorn, C. F., & Orosz, K. (2004). Tumor Angiogenesis in mice and Men. *Cancer Biology & Therapy*, 3(6), 498–500.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. a., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389
- Altschup, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Alva, J. A., Zovein, A. C., Monvoisin, A., Murphy, T., Salazar, A., Harvey, N. L., ... Iruela-Arispe, M. L. (2006). VE-cadherin-cre-recombinase transgenic mouse: A tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Developmental Dynamics*, 235(3), 759–767. doi:10.1002/dvdy.20643
- Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. a, ... Thomson, J. a. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology*, 227(2), 271–278. doi:10.1006/dbio.2000.9912
- An, Z., Wang, X., Geller, J., Moossa, A. R., & Hoffman, R. M. (1998). Surgical orthotopic implantation allows high lung and lymph node metastatic expression of human prostate carcinoma cell line PC-3 in nude mice. *The Prostate*, 34(3), 169–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9492844>
- Anda-Jáuregui, G., Mejía-Pedroza, R. A., Espinal-Enríquez, J., & Hernández-Lemus, E. (2015). Crosstalk events in the estrogen signaling pathway may affect tamoxifen efficacy in breast cancer molecular subtypes. *Computational Biology and Chemistry*, 59, 42–54. doi:10.1016/j.compbiolchem.2015.07.004
- Ang, J., Fang, B., Ashman, L. K., & Frauman, A. G. (2010). The migration and invasion of human prostate cancer cell lines involves CD151 expression. *Oncology Reports*, 24, 1593–1597. doi:10.3892/or

- Ang, J., Lijovic, M., Ashman, L. K., Kan, K., & Frauman, A. G. (2004). CD151 Protein Expression Predicts the Clinical Outcome of Low-Grade Primary Prostate Cancer Better than Histologic Grading: A New Prognostic Indicator? CD151 Protein Expression Predicts the Clinical Outcome of Low-Grade Primary Prostate Cancer Better th. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 13, 1717–1721.
- Apetoh, L., Mignot, G., Panaretakis, T., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2008). Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 14, 141–151. doi:10.1016/j.molmed.2008.02.002
- Argos, P., Landy, a, Abremski, K., Egan, J. B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R. H., ... Pierson, L. S. (1986). The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *The EMBO Journal*, 5(2), 433–440.
- Arroyo, A. G., & Iruela-Arispe, M. L. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular Research*, 86(2), 226–35. doi:10.1093/cvr/cvq049
- Aster, J. C., & Blacklow, S. C. (2012). Targeting the Notch pathway: Twists and turns on the road to rational therapeutics. *Journal of Clinical Oncology*, 30(19), 2418–2420. doi:10.1200/JCO.2012.42.0992
- Aster, J. C., Blacklow, S. C., & Pear, W. S. (2011). Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. *The Journal of Pathology*, 223(2), 262–73. doi:10.1002/path.2789
- Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., ... Carmeliet, P. (2003). Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature Medicine*, 9(7), 936–43. doi:10.1038/nm884
- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19, 329–337. doi:10.1007/978-3-540-33177-3_4
- Baffert, F., Le, T., Sennino, B., Thurston, G., Kuo, C. J., Hu-Lowe, D., & McDonald, D. M. (2006). Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 290(2), H547–59. doi:10.1152/ajpheart.00616.2005
- Baffert, F., Thurston, G., Rochon-Duck, M., Le, T., Brekken, R., & McDonald, D. M. (2004). Age-related changes in vascular endothelial growth factor dependency and angiopoietin-1-induced plasticity of adult blood vessels. *Circulation Research*, 94(7), 984–92. doi:10.1161/01.RES.0000125295.43813.1F
- Bagley Jr., C. M., Lane, R. F., Blasko, J. C., Grimm, P. D., Ragde, H., Cobb, O. E., & Rowbotham, R. K. (2002). Adjuvant chemohormonal therapy of high risk prostate carcinoma. Ten year results. *Cancer*, 94(10), 2728–2732. doi:10.1002/cncr.10527
- Baguley, B. C., & Wilson, W. R. (2002). Potential of DMXAA combination therapy for solid tumors. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2(5), 593–603. doi:10.1586/14737140.2.5.593
- Bailey, R. L., Herbert, J. M., Khan, K., Heath, V. L., Bicknell, R., & Tomlinson, M. G. (2011). The emerging role of tetraspanin microdomains on endothelial cells. *Biochemical Society Transactions*, 39(6), 1667–73. doi:10.1042/BST20110745
- Baird, J. R., Byrne, K. T., Lizotte, P. H., Toraya-Brown, S., Scarlett, U. K., Alexander, M. P., ... Fiering, S. (2013). Immune-mediated regression of established B16F10 melanoma by intratumoral injection of attenuated *Toxoplasma gondii* protects against rechallenge. *J Immunol*, 190(1), 469–478. doi:10.4049/jimmunol.1201209rjimmunol.1201209 [pii]
- Balint, K., Xiao, M., Pinnix, C. C., Soma, A., Veres, I., Juhasz, I., ... Liu, Z. (2005). Activation of Notch1 signaling is required for β -catenin – mediated human primary melanoma progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3166–3176. doi:10.1172/JCI25001.3166
- Ballard, P. L. (1989). Hormonal regulation of pulmonary surfactant. *Endocrine Reviews*, 10(2), 165–81.
- Ballou, B., Lagerholm, B. C., Ernst, L. A., Bruchez, M. P., & Waggoner, A. S. (2004).

- Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjugate Chemistry*, 15(1), 79–86. doi:10.1021/bc034153y
- Baluk, P., Hashizume, H., & McDonald, D. M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15(1), 102–111. doi:10.1016/j.gde.2004.12.005
- Banerjee, D., Hernandez, S. L., Garcia, A., Kangsamaksin, T., Sbiroli, E., Andrews, J., ... Yamashiro, D. J. (2015). Notch suppresses angiogenesis and progression of hepatic metastases. *Cancer Research*, 75(8), 1592–602. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1493
- Bari, R., Zhang, Y. H., Zhang, F., Wang, N. X., Stipp, C. S., Zheng, J. J., & Zhang, X. A. (2009). Transmembrane Interactions Are Needed for KAI1/CD82-Mediated Suppression of Cancer Invasion and Metastasis. *The American Journal of Pathology*, 174(2), 647–660. doi:10.2353/ajpath.2009.080685
- Barnett, S. C., & Eccles, S. A. (1984). Studies of mammary carcinoma metastasis in a mouse model system. I: Derivation and characterization of cells with different metastatic properties during tumour progression in vivo. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2(1), 15–36. doi:10.1007/BF00132304
- Barreiro, O., Yáñez-Mó, M., Sala-Valdés, M., Gutiérrez-López, M. D., Ovalle, S., Higginbottom, A., ... Sánchez-Madrid, F. (2005). Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood*, 105(7), 2852–2861. doi:10.1182/blood-2004-09-3606
- Barreiro, O., Zamai, M., Yáñez-Mó, M., Tejera, E., López-Romero, P., Monk, P. N., ... Sánchez-Madrid, F. (2008). Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *The Journal of Cell Biology*, 183(3), 527–42. doi:10.1083/jcb.200805076
- Barsoum, I. B., Smallwood, C. A., Siemens, D. R., & Graham, C. H. (2014). A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Research*, 74(3), 665–74. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0992
- Bass, R., Werner, F., Odintsova, E., Sugiura, T., Berditchevski, F., & Ellis, V. (2005). Regulation of Urokinase Receptor Proteolytic Function by the Tetraspanin CD82. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 14811–14818. doi:10.1074/jbc.M414189200
- Batchelor, T. T., Sorensen, A. G., di Tomaso, E., Zhang, W.-T., Duda, D. G., Cohen, K. S., ... Jain, R. K. (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*, 11(1), 83–95. doi:10.1016/j.ccr.2006.11.021
- Bayer-Garner, I. B., Hough, A. J., & Smoller, B. R. (1999). Vascular endothelial growth factor expression in malignant melanoma: prognostic versus diagnostic usefulness. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 12(8), 770–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10463478>
- Beel, A. J., & Sanders, C. R. (2008). Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 65(9), 1311–34. doi:10.1007/s00018-008-7462-2
- Beijnum, J. R. Van, Nowak-sliwinska, P., Huijbers, E. J. M., Thijssen, V. L., & Griffioen, A. W. (2015). The Great Escape ; the Hallmarks of Resistance to Antiangiogenic Therapy, (April), 441–461.
- Bellou, S., Pentheroudakis, G., Murphy, C., & Fotsis, T. (2013). Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and hydra. *Cancer Letters*, 338, 219–228. doi:10.1016/j.canlet.2013.05.015
- Benazzi, C., Al-Dissi, a, Chau, C. H., Figg, W. D., Sarli, G., de Oliveira, J. T., & Gärtner, F. (2014). Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 919570. doi:10.1155/2014/919570
- Benedito, R., & Duarte, A. (2005). Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles. *Gene Expression Patterns*, 5(6), 750–755.

- doi:10.1016/j.modgep.2005.04.004
- Benedito, R., & Hellström, M. (2013). Notch as a hub for signaling in angiogenesis. *Experimental Cell Research*, 319(9), 1281–1288. doi:10.1016/j.yexcr.2013.01.010
- Benedito, R., Roca, C., Sörensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., & Adams, R. H. (2009). The Notch Ligands Dll4 and Jagged1 Have Opposing Effects on Angiogenesis. *Cell*, 137(6), 1124–1135. doi:10.1016/j.cell.2009.03.025
- Benedito, R., Rocha, S. F., Woeste, M., Zamykal, M., Radtke, F., Casanovas, O., ... Adams, R. H. (2012). Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature*, 484(7392), 110–4. doi:10.1038/nature10908
- Benedito, R., Trindade, A., Hirashima, M., Henrique, D., da Costa, L. L., Rossant, J., ... Duarte, A. (2008). Loss of Notch signalling induced by Dll4 causes arterial calibre reduction by increasing endothelial cell response to angiogenic stimuli. *BMC Developmental Biology*, 8, 117. doi:10.1186/1471-213X-8-117
- Bengtsson, M., Karlsson, H. J., Westman, G., & Kubista, M. (2003). A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 31(8), e45. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=153757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Berdichevski, F., Bazzoni, G., & Hemler, M. E. (1995). Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(30), 17784–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7629079>
- Berger, M. R. (1999). Autochthonous Tumor Models in Rats: Is There Still a Relevance for Anticancer Drug Development? In H. H.- Fiebig & A. M. Burger (Eds.), *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (pp. 15–27). Karger Publishers. doi:10.1159/000425820
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 401–410. doi:10.1038/nrc1093
- Bergers, G., & Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 8(8), 592–603. doi:10.1038/nrc2442.
- Beviglia, L., Yeung, P., Fischer, M., Yen, W.-C., Lewicki, J., Gurney, A., ... Kapoun, A. (2011). Abstract 2834: Anti-DLL4 treatment inhibits melanoma tumor growth, recurrence, metastases, and reduces frequency of cancer stem cells in a clinically relevant tumor model in NOD/SCID mice. *Cancer Research*, 71(8 Supplement), 2834–2834. doi:10.1158/1538-7445.AM2011-2834
- Beynen, A. C., & Hau, J. (2001). Animal models. In L. F. M. Van Zutphen, V. Baumans, & A. C. Beynen (Eds.), *Principles of laboratory animal science* (Second., pp. 197–205). Elsevier Ltd.
- Bibby, M. C. (2004). Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 40(6), 852–7. doi:10.1016/j.ejca.2003.11.021
- Billiard, F., Kirshner, J. R., Tait, M., Danave, A., Taheri, S., Zhang, W., ... Skokos, D. (2011). Ongoing Dll4-Notch signaling is required for T-cell homeostasis in the adult thymus. *European Journal of Immunology*, 41, 2207–2216. doi:10.1002/eji.201041343
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513 – 1524.
- Bin Hafeez, B., Adhami, V. M., Asim, M., Siddiqui, I. A., Bhat, K. M., Zhong, W., ... Mukhtar, H. (2009). Targeted knockdown of Notch1 inhibits invasion of human prostate cancer cells concomitant with inhibition of matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(2), 452–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1631
- Blakey, D. C., Westwood, F. R., Walker, M., Hughes, G. D., Davis, P. D., Ashton, S. E., & Ryan, A. J. (2002). Antitumor activity of the novel vascular targeting agent ZD6126 in a

- panel of tumor models. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(6), 1974–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060643>
- Bobek, V., Kolostova, K., Pinterova, D., Boubelik, M., Gurlich, R., & Hoffman, R. M. (2011). Tail spontaneous metastatic mouse model: comparison of metastatic potential of orthotopic and heterotopic models imaged by GFP and RFP protein. *In Vivo*, 25, 849–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021676>
- Bobek, V., Kolostova, K., Pinterova, D., Kacprzak, G., Adamiak, J., Kolodziej, J., ... Hoffman, R. M. (2010). A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. *Anticancer Research*, 30(12), 4799–803. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187455>
- Bodley, a., Liu, L. F., Israel, M., Seshadri, R., Koseki, Y., Giuliani, F. C., ... Potmesil, M. (1989). DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA. *Cancer Research*, 49, 5969–5978.
- Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., & O'Reilly, M. S. (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390(6658), 404–7. doi:10.1038/37126
- Bogenmann, E. (1996). A metastatic neuroblastoma model in SCID mice. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 67(3), 379–85. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960729)67:3<379::AID-IJC12>3.0.CO;2-3
- Boone, B., Blokx, W., De Bacquer, D., Lambert, J., Ruiter, D., & Brochez, L. (2008). The role of VEGF-C staining in predicting regional metastasis in melanoma. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology*, 453(3), 257–65. doi:10.1007/s00428-008-0641-6
- Booser, D. J., & Hortobagyi, G. N. (1994). Anthracycline Antibiotics in Cancer Therapy: Focus on Drug Resistance. *Drugs*, 47(2), 223–258. doi:10.2165/00003495-199447020-00002
- Boucheix, C. (2001). Tetraspanins. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(9), 1189–1205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11577978>
- Boucheix, C., Duc, G. H. T., Jasmin, C., & Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins and malignancy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 3(January), 1–17. doi:10.1017/S1462399401002381
- Boucher, Y., Brekken, C., Netti, P. A., Baxter, L. T., & Jain, R. K. (1998). Intratumoral infusion of fluid: estimation of hydraulic conductivity and implications for the delivery of therapeutic agents. *British Journal of Cancer*, 78(11), 1442–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2063228&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., & Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309(5965), 255–256. doi:10.1038/309255a0
- Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., & Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 85(12), 1301–7. doi:10.1007/s00109-007-0281-3
- Bresalier, R. S., Hujanen, E. S., Raper, S. E., Roll, F. J., Itzkowitz, S. H., Martin, G. R., & Kim, Y. S. (1987). An Animal Model for Colon Cancer Metastasis: Establishment and Characterization of Murine Cell Lines with Enhanced liver-metastasizing ability. *Cancer Research*, 47, 1398–1406.
- Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of Surgery*, 172(5), 902–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1397358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Briles, E. B., & Kornfeld, S. (1978). Isolation and Metastatic Properties of Detachment Variants of 816 Melanoma Cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 60(6), 1217–1222.
- Brinster, R. L., Chen, H. Y., Messing, A., van Dyke, T., Levine, A. J., & Palmiter, R. D. (1984). Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors.

- Cell*, 37(2), 367–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6327063>
- Broach, J. R., & Hicks, J. B. (1980). Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 μ circle. *Cell*, 21(2), 501–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7407923>
- Brooks, S., & Schumacher, U. (2001). *Metastasis research protocols*. (1st ed.). Totowa N.J.: Humana Press.
- Brown, K., Buchmann, A., & Balmain, A. (1990). Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(2), 538–42. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=53300&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Brünner, N., Boysen, B., Rømer, J., & Spang-Thomsen, M. (1993). The nude mouse as an in vivo model for human breast cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 24(3), 257–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8435480>
- Brunskill, E. W., Aronow, B. J., Georgas, K., Rumballe, B., Valerius, M. T., Aronow, J., ... Potter, S. S. (2008). Atlas of Gene Expression in the Developing Kidney at Microanatomic Resolution. *Developmental Cell*, 15(5), 781–791. doi:10.1016/j.devcel.2008.09.007
- Burghoff, S., Gong, X., Viethen, C., Jacoby, C., Flögel, U., Bongardt, S., ... Schrader, J. (2014). Growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells is not critically dependent on host CD73 expression in mice. *BMC Cancer*, 14, 898. doi:10.1186/1471-2407-14-898
- Burri, P. H., Hlushchuk, R., & Djonov, V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental Dynamics*, 231(3), 474–488. doi:10.1002/dvdy.20184
- Bussolati, B., Grange, C., & Camussi, G. (2011). Tumor exploits alternative strategies to achieve vascularization. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(9), 2874–2882. doi:10.1096/fj.10-180323
- Cadili, A. (2009). The role of angiogenesis in melanoma metastasis. *Journal Compilation Royal Australasian College of Surgeons*, 79(11), 774–776. doi:10.1111/j.1445-2197.2009.05100.x
- Cailleateau, L., Estrach, S., Thyss, R., Boyer, L., Doye, A., Domange, B., ... Mettouchi, A. (2010). $\alpha 2\beta 1$ integrin controls association of Rac with the membrane and triggers quiescence of endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 123, 2491–2501. doi:10.1242/jcs.058875
- Cajot, J. F., Sordat, I., Silvestre, T., & Sordat, B. (1997). Differential display cloning identifies motility-related protein (MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 57(13), 2593–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9205061>
- Calcinotto, A., Filipazzi, P., Grioni, M., Iero, M., De Milito, A., Ricupito, A., ... Rivoltini, L. (2012). Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Research*, 72(11), 2746–56. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1272
- Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D. V. F., Iglesias, M., Céspedes, M. V., ... Batlle, E. (2012). Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*, 22(5), 571–84. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.013
- Cameron, M. D., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Nadkarni, K. V., Morris, V. L., Groom, A. C., ... Macdonald, I. C. (2000). Temporal Progression of Metastasis in Lung : Cell Survival , Dormancy , and Location Dependence of Metastatic Inefficiency Temporal Progression of Metastasis in Lung : Cell Survival , Dormancy , and. *Cancer Research*, (60), 2541–2546.
- Camphausen, K., Moses, M. a, Beecken, W., Khan, M. K., Folkman, J., & O'Reilly, M. S. (2001). Radiation Therapy to a Primary Tumor Accelerates Metastatic Growth in Mice.

- Cancer Res.*, 61(5), 2207–2211. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/61/5/2207>
- Cannistra, S. A. (2008). Challenges and pitfalls of combining targeted agents in phase I studies. *Journal of Clinical Oncology*, 26(22), 3665–3667. doi:10.1200/JCO.2008.17.2676
- Cao, Y. (2008). Molecular Mechanisms and Therapeutic Development of Angiogenesis Inhibitors. *Advances in Cancer Research*, 100(08), 113–131. doi:10.1016/S0065-230X(08)00004-3
- Cao, Y., & Langer, R. (2010). Optimizing the delivery of cancer drugs that block angiogenesis. *Science Translational Medicine*, 2(15), 15ps3. doi:10.1126/scitranslmed.3000399
- Cao, Y., Zhong, W., & Sun, Y. (2009). Improvement of antiangiogenic cancer therapy by understanding the mechanisms of angiogenic factor interplay and drug resistance. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 338–343. doi:10.1016/j.semcancer.2009.05.001
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the Genome by Homologous Recombination. *Science*, 244, 1288–1292.
- Capozza, F., Trimmer, C., Castello-Cros, R., Katiyar, S., Whitaker-Menezes, D., Follenzi, A., ... Lisanti, M. P. (2012). Genetic ablation of Cav1 differentially affects melanoma tumor growth and metastasis in mice: Role of Cav1 in Shh heterotypic signaling and transendothelial migration. *Cancer Research*, 72(9), 2262–2274. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2593
- Carmeliet, P. (1999). Controlling the cellular brakes. *Nature*, 401(6754), 657–658. doi:10.1038/44304 [doi]
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257. doi:10.1038/35025220
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011a). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis (VO). *Nature*, 473(7347), 298–307. doi:10.1038/nature10144.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011b). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(6), 417–427. doi:10.1038/nrd3455
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., ... Persico, M. G. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine*, 7(5), 575–83. doi:10.1038/87904
- Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G., & Hanahan, D. (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell*, 8(4), 299–309. doi:10.1016/j.ccr.2005.09.005
- Casazza, A., Di Conza, G., Wenes, M., Finisguerra, V., Deschoemaeker, S., & Mazzone, M. (2014). Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene*, 33(14), 1743–54. doi:10.1038/onc.2013.121
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. a. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6024), 1559–1564. doi:10.1126/science.1203543
- Chaires, J. B., Dattagupta, N., & Crothers, D. M. (1982). Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 21, 3933–3940. doi:10.1021/bi00260a005
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews. Cancer*, 2(8), 563–72. doi:10.1038/nrc865
- Chambers, A. F., & Ling, V. (1984). Selection for experimental metastatic ability of heterologous tumor cells in the chick embryo after DNA-mediated transfer. *Cancer Research*, 44(9), 3970–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6744313>
- Chambers, A. F., Naumov, G. N., Varghese, H. J., Nadkarni, K. V., MacDonald, I. C., & Groom, A. C. (2001). Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 10(2), 243–55, vii. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11382585>
- Champy, M.-F., Le Voci, L., Selloum, M., Peterson, L. B., Cumiskey, a M., & Blom, D. (2011). Reduced body weight in male Tspan8-deficient mice. *International Journal of Obesity* (2005), 35(4), 605–17. doi:10.1038/ijo.2010.165
- Chan, K. S., Carbajal, S., Kiguchi, K., Clifford, J., Sano, S., & DiGiovanni, J. (2004). Epidermal growth factor receptor-mediated activation of Stat3 during multistage skin carcinogenesis. *Cancer Research*, 64(7), 2382–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059889>
- Chaplin, D. J., Olive, P. L., & Durand, R. E. (1987). Intermittent Blood Flow in a Murine Tumor : Radiobiological Effects. *Cancer Research*, 47, 597–601.
- Chaplin, D. J., Pettit, G. R., & Hill, S. A. (1999). Anti-vascular approaches to solid tumour therapy: evaluation of combretastatin A4 phosphate. *Anticancer Research*, 19(1A), 189–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10226542>
- Chappell, J. C., Mouillesseaux, K. P., & Bautch, V. L. (2013). Flt-1 (vascular endothelial growth factor receptor-1) is essential for the vascular endothelial growth factor-notch feedback loop during angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(8), 1952–1959. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301805
- Chappell, J. C., Taylor, S. M., Ferrara, N., & Bautch, V. L. (2009). Local Guidance of Emerging Vessel Sprouts Requires Soluble Flt-1. *Developmental Cell*, 17(3), 377–386. doi:10.1016/j.devcel.2009.07.011
- Charrin, S., Jouannet, S., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2014). Tetraspanins at a glance. *Journal of Cell Science*, (August), 1–8. doi:10.1242/jcs.154906
- Charrin, S., le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P.-E., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *The Biochemical Journal*, 420(2), 133–54. doi:10.1042/BJ20082422
- Chen, J., Imanaka, N., & Griffin, J. D. (2010). Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*, 102(2), 351–60. doi:10.1038/sj.bjc.6605486
- Chen, L., Lu, Y., Wu, J. ming, Xu, B., Zhang, L. juan, Gao, M., ... Lei, N. (2009). Ligustrazine inhibits B16F10 melanoma metastasis and suppresses angiogenesis induced by Vascular Endothelial Growth Factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(2), 374–379. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.042
- Chen, T. T., Luque, A., Lee, S., Anderson, S. M., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2010). Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *Journal of Cell Biology*, 188(4), 595–609. doi:10.1083/jcb.200906044
- Chien, A. J., Moore, E. C., Lonsdorf, A. S., Kulikaukas, R. M., Rothberg, B. G., Berger, A. J., ... Moon, R. T. (2009). Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), 1193–8. doi:10.1073/pnas.0811902106
- Chien, C.-W., Lin, S.-C., Lai, Y.-Y., Lin, B.-W., Lin, S.-C., Lee, J.-C., & Tsai, S.-J. (2008). Regulation of CD151 by hypoxia controls cell adhesion and metastasis in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(24), 8043–51. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1651
- Chiorean, E. G., LoRusso, P., Strother, R. M., Diamond, J. R., Younger, A., Messersmith, W. A., ... Jimeno, A. (2015). A Phase I First-in-Human Study of Enoticumab (REGN421), a Fully Human Delta-like Ligand 4 (Dll4) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 21(12), 2695–703. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2797
- Chishima, T., Miyagi, Y., Wang, X., Yamaoka, H., Shimada, H., Moossa, a R., & Hoffman, M. (1997). Cancer Invasion and Micrometastasis Visualized in Live Tissue by Green Fluorescent Protein Expression. *Cancer Research*, 57, 2042–2047.

- Chung, A. S., Kowanetz, M., Wu, X., Zhuang, G., Ngu, H., Finkle, D., ... Ferrara, N. (2012). Differential drug class-specific metastatic effects following treatment with a panel of angiogenesis inhibitors. *The Journal of Pathology*, 227(4), 404–16. doi:10.1002/path.4052
- Chung, A. S., Lee, J., & Ferrara, N. (2010). Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 10(jULy), 505–514. doi:10.1038/nrc2868
- Claas, C., Seiter, S., Claas, A., Savelyeva, L., Schwab, M., & Zöller, M. (1998). Association Between the Rat Homologue of CO-029, a Metastasis-associated Tetraspanin Molecule and Consumption Coagulopathy. *The Journal of Cell Biology*, 141(1), 267–80. doi:10.1083/jcb.141.1.267
- Clarke, R. (1996). Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, 39(1), 69–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8738607>
- ClinicalTrials.gov. (2012). A Phase 1 Dose Escalation Study of OMP-21M18 in Subjects With Solid Tumors. Retrieved February 23, 2016, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00744562>
- ClinicalTrials.gov. (2014). A Multiple-Ascending-Dose Study of the Safety and Tolerability of REGN421(SAR153192) in Patients With Advanced Solid Malignancies. Retrieved February 23, 2016, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00871559>
- Colegio, O. R., Chu, N.-Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., ... Medzhitov, R. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*, 513(7519), 559–563. doi:10.1038/nature13490
- Collins, F. S., & Rossant, J. (2007). A Mouse for All Reasons. *Cell*, 128, 9–13. doi:10.1016/j.cell.2006.12.018
- Collu, G. M., Hidalgo-Sastre, A., & Brennan, K. (2014). Wnt-Notch signalling crosstalk in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, 3553–3567. doi:10.1007/s00018-014-1644-x
- Colombel, M., Filleur, S., Fournier, P., Merle, C., Guglielmi, J., Courtin, A., ... Cabon, F. (2005). Androgens repress the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in normal and neoplastic prostate. *Cancer Research*, 65(1), 300–308. doi:65/1/300 [pii]
- Cooke, V. G., LeBleu, V. S., Keskin, D., Khan, Z., O'Connell, J. T., Teng, Y., ... Kalluri, R. (2012). Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer Cell*, 21(1), 66–81. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.024
- Copeland, B. T., Bowman, M. J., & Ashman, L. K. (2013). Genetic ablation of the tetraspanin CD151 reduces spontaneous metastatic spread of prostate cancer in the TRAMP model. *Molecular Cancer Research: MCR*, 11(1), 95–105. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0468
- Copeland, B. T., Bowman, M. J., Boucheix, C., & Ashman, L. K. (2013). Knockout of the tetraspanin Cd9 in the TRAMP model of de novo prostate cancer increases spontaneous metastases in an organ-specific manner. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 133(8), 1803–12. doi:10.1002/ijc.28204
- Cornil, I., Man, S., Fernandez, B., & Kerbel, R. S. (1989). Enhanced tumorigenicity, melanogenesis, and metastases of a human malignant melanoma after subdermal implantation in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 81(15), 938–944.
- Cory, S., & Adams, J. M. (1988). Transgenic mice and oncogenesis. *Annual Review of Immunology*, 6, 25–48. doi:10.1146/annurev.iy.06.040188.000325
- Coultas, L., Chawengsaksophak, K., & Rossant, J. (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 438(December), 937–945. doi:10.1038/nature04479
- Crum, R., Szabo, S., & Folkman, J. (1985). A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4732), 1375–8.

- Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2416056>
- Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P., & Kerbel, R. S. (2008). Development of a preclinical model of spontaneous human melanoma central nervous system metastasis. *Cancer Research*, 68(12), 4500–5. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0041
- D'Amato, R. J., Loughnan, M. S., Flynn, E., & Folkman, J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), 4082–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=43727&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Danielian, P. S., White, R., Hoare, S. A., Fawell, S. E., & Parker, M. G. (1993). Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 7(2), 232–40. doi:10.1210/mend.7.2.8469236
- Dark, G. G., Hill, S. A., Prise, V. E., Tozer, G. M., Pettit, G. R., & Chaplin, D. J. (1997). Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Research*, 57(10), 1829–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9157969>
- Davis, D. W., Shen, Y., Mullani, N. A., Wen, S., Herbst, R. S., O'Reilly, M., ... McConkey, D. J. (2004). Quantitative analysis of biomarkers defines an optimal biological dose for recombinant human endostatin in primary human tumors. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(1 Pt 1), 33–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734449>
- Dawson, M. R., Duda, D. G., Chae, S.-S., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2009). VEGFR1 activity modulates myeloid cell infiltration in growing lung metastases but is not required for spontaneous metastasis formation. *PloS One*, 4(9), e6525. doi:10.1371/journal.pone.0006525
- De Nardo, P. (1997). [Veterinary environmental epidemiology: the case of respiratory pathology in the dog]. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità*, 33(4), 587–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9616969>
- Dejana, E. (1996). Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 98(9), 1949–1953. doi:10.1172/JCI118997
- Demicheli, R., Retsky, M. W., Hrushesky, W. J. M., Baum, M., & Gukas, I. D. (2008). The effects of surgery on tumor growth: A century of investigations. *Annals of Oncology*, 19(11), 1821–1828. doi:10.1093/annonc/mdn386
- Denekamp, J. (1982). Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumour therapy. *British Journal of Cancer*, 45(1), 136–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2010961&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Denekamp, J. (1984). Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiologica. Oncology*, 23(4), 217–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6208746>
- Deng, G., Ma, L., Meng, Q., Ju, X., Jiang, K., Jiang, P., & Yu, Z. (2015). Notch signaling in the prostate: critical roles during development and in the hallmarks of prostate cancer biology. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. doi:10.1007/s00432-015-1946-x
- Deng, X., Li, Q., Hoff, J., Novak, M., Yang, H., Jin, H., ... Yang, X. H. (2012). Integrin-associated CD151 drives ErbB2-evoked mammary tumor onset and metastasis. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 14(8), 678–89. doi:10.1593/neo.12922
- Denmeade, S. R., & Isaacs, J. T. (2002). A history of prostate cancer treatment. *Nature Reviews. Cancer*, 2(5), 389–96. doi:10.1038/nrc801
- Dewerchin, M., & Carmeliet, P. (2012). PlGF : a multitasking cytokine with disease-restricted

- activity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), a011056. doi:10.1101/cshperspect.a011056
- Dickson, P. V., Hamner, J. B., Sims, T. L., Fraga, C. H., Ng, C. Y. C., Rajasekeran, S., ... Davidoff, A. M. (2007). Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(13), 3942–50. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0278
- Diehn, F. E., Costouros, N. G., Miller, M. S., Feldman, A. L., Alexander, H. R., Li, K. C. P., & Libutti, S. K. (2002). Noninvasive fluorescent imaging reliably estimates biomass in vivo. *BioTechniques*, 33(6), 1250–2, 1254–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12503309>
- Diez, H., Fischer, A., Winkler, A., Hu, C. J., Hatzopoulos, A. K., Breier, G., & Gessler, M. (2007). Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Experimental Cell Research*, 313(1), 1–9. doi:10.1016/j.yexcr.2006.09.009
- Diez-Roux, G., Banfi, S., Sultan, M., Geffers, L., Anand, S., Rozado, D., ... Ballabio, A. (2011). A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biology*, 9(1), e1000582. doi:10.1371/journal.pbio.1000582
- Djeha, H., Green, C., Ireson, C., & Kelland, L. R. (2006). Synergistic in vivo antitumor activity in lung and colon cancer xenografts with the vascular disrupting agent DMXAA combined with bevacizumab. *Cancer Res.*, 66(8_Supplement), 55–a–. Retrieved from http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/8_Supplement/55.2
- Djeha, H., Shah, K., McGeever, G., Dobinson, D., & Green, C. (2007). Combination of the vascular disrupting agent DMXAA (AS1404) with bevacizumab and paclitaxel produces synergistic antitumor activity in lung cancer xenografts. *Cancer Res.*, 67(9_Supplement), 4642–. Retrieved from http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/9_Supplement/4642
- Djokovic, D., Trindade, A., Gigante, J., Badenes, M., Silva, L., Liu, R., ... Duarte, A. (2010). Combination of Dll4/Notch and Ephrin-B2/EphB4 targeted therapy is highly effective in disrupting tumor angiogenesis. *BMC Cancer*, 10(1), 641. doi:10.1186/1471-2407-10-641
- Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S., & Smithies, O. (1987). Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 330(6148), 576–8. doi:10.1038/330576a0
- Dong, J. T., Lamb, P. W., Rinker-Schaeffer, C. W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J. T., & Barrett, J. C. (1995). KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5212), 884–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7754374>
- Dornier, E., Coumailleau, F., Ottavi, J.-F., Moretti, J., Boucheix, C., Mauduit, P., ... Rubinstein, E. (2012). TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. *The Journal of Cell Biology*, 199(3), 481–96. doi:10.1083/jcb.201201133
- Doroshov, J. H. (1986). Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(June), 4514–4518. doi:10.1073/pnas.83.12.4514
- Double, J. A., Ball, C. R., & Cowen, P. N. (1975). Transplantation of adenocarcinomas of the colon in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 54(1), 271–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1113308>
- Doyle, A., McGarry, M. P., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2012). The Construction of Transgenic and Gene Knockout/Knockin Mouse Models of Human Disease. *Transgenic Research*, 21(2), 327–349. doi:10.1007/s11248-011-9537-3
- Dua, P., Ingle, A., & Gude, R. P. (2007). Suramin augments the antitumor and antimetastatic

- activity of pentoxifylline in B16F10 melanoma. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 121(7), 1600–8. doi:10.1002/ijc.22843
- Duarte, A., Hirashima, M., Benedito, R., Trindade, A., Diniz, P., Bekman, E., ... Rossant, J. (2004). Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes & Development*, 18(20), 2474–2478. doi:10.1101/gad.1239004
- Dufraine, J., Funahashi, Y., & Kitajewski, J. (2008). Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene*, 27(38), 5132–7. doi:10.1038/onc.2008.227
- Dymecki, S. M. (1996). Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(June), 6191–6196.
- Dymecki, S. M. (2000). Site-specific recombination in cells and mice. In A. L. Joyner (Ed.), *Gene Targeting: a practical approach* (2nd ed., pp. 37–99). Oxford University Press.
- Eakin, G. S., & Hadjantonakis, A.-K. (2006). Production of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos. *Nature Protocols*, 1(3), 1145–1153. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate
- Easty, G. C., Easty, D. M., & Tchao, R. (1969). The growth of heterologous tumour cells in chick embryos. *European Journal of Cancer*, 5(3), 287–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5786070>
- Ebos, J. M. L., & Kerbel, R. S. (2011). Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 8(4), 210–21. doi:10.1038/nrclinonc.2011.21
- Ebos, J. M. L., Lee, C. R., Christensen, J. G., Mutsaers, A. J., & Kerbel, R. S. (2007). Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 17069–74. doi:10.1073/pnas.0708148104
- Ebos, J. M. L., Lee, C. R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G. a, Christensen, J. G., & Kerbel, R. S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 15(3), 232–9. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.021
- Eccles, S. A. (1983). Differentiation and neoplasia. Invasion and metastasis; experimental systems. *The Journal of Pathology*, 141(3), 333–53. doi:10.1002/path.1711410311
- Eccles, S. A. (2001). Basic principles for the study of metastasis using Animal Models. In S. A. Brooks & U. Schumacher (Eds.), *Metastasis Research Protocols, Vol.2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo* (1st ed., Vol. 2, pp. 161–171). Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Ehling, M., & Mazzone, M. (2016). Vessel Normalization in the Spot-LIGHT of Cancer Treatment. *Trends in Molecular Medicine*, 22(2), 85–87. doi:10.1016/j.molmed.2015.12.009
- Eilken, H. M., & Adams, R. H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(5), 617–625. doi:10.1016/j.ceb.2010.08.010
- Eklund, L., Bry, M., & Alitalo, K. (2013). Mouse models for studying angiogenesis and lymphangiogenesis in cancer. *Molecular Oncology*, 7(2), 259–282. doi:10.1016/j.molonc.2013.02.007
- Elledge, S. J., Mulligan, J. T., Ramer, S. W., Spottswood, M., & Davis, R. W. (1991). Lambda YES: a multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and Escherichia coli mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), 1731–5.
- Eriksson, A., Cao, R., Pawliuk, R., Berg, S.-M., Tsang, M., Zhou, D., ... Cao, Y. (2002). Placenta Growth Factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell*, 1(1), 99–108. doi:10.1016/S1535-6108(02)00028-4
- Eskens, F. A. L. M. (2004). Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now

- and where are we going? *British Journal of Cancer*, 90(1), 1–7. doi:10.1038/sj.bjc.6601401
- Euhus, D. M., Hudd, C., LaRegina, M. C., & Johnson, F. E. (1986). Tumor measurement in the nude mouse. *Journal of Surgical Oncology*, 31(4), 229–234. doi:10.1002/jso.2930310402
- European Commission. (2010a). Are mice relevant models for human disease? In *Of mice and men - are mice relevant models for human disease* (pp. 1–10). London.
- European Commission. (2010b). Of mice and men – are mice relevant models for human disease? In *Of mice and men – are mice relevant models for human disease?* (pp. 1–10).
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154–156. doi:10.1038/292154a0
- Faivre, S., Demetri, G., Sargent, W., & Raymond, E. (2007). Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(9), 734–45. doi:10.1038/nrd2380
- Falcón, B. L., Hashizume, H., Koumoutsakos, P., Chou, J., Bready, J. V., Coxon, A., ... McDonald, D. M. (2009). Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *The American Journal of Pathology*, 175(5), 2159–70. doi:10.2353/ajpath.2009.090391
- Fallowfield, M. E., & Cook, M. G. (1991). The vascularity of primary cutaneous melanoma. *Journal of Pathology*, 164(3), 241–244.
- Fan, J., Zhu, G.-Z., & Niles, R. M. (2010). Expression and function of CD9 in melanoma cells. *Molecular Carcinogenesis*, 49(1), 85–93. doi:10.1002/mc.20580
- Farago, A. F., Snyder, E. L., & Jacks, T. (2012). SnapShot: Lung Cancer Models. *Cell*, 149(1), 246–246.e1. doi:10.1016/j.cell.2012.03.015
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., & Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 10887–90. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38252&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(3), 752–7. doi:10.1006/bbrc.1997.7124
- Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., & Alnemri, E. S. (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(49), 30761–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7983002>
- Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews. Cancer*, 2(10), 795–803. doi:10.1038/nrc909
- Ferrara, N., & Henzel, W. J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161(2), 851–858. doi:10.1016/j.bbrc.2012.08.021
- Ferrara, N., & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438, 967–74. doi:10.1038/nature04483
- Fidler, I. J. (1973). Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. *Nature*, 242(118), 148–149. doi:10.1038/10.1038/newbio242148a0
- Fidler, I. J. (1975). Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival in Vivo. *Cancer Research*, 35(January), 218–224.
- Fidler, I. J. (1980). Therapy of spontaneous metastases by intravenous injection of liposomes containing lymphokines. *Science (New York, N.Y.)*, 208(4451), 1469–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7384789>
- Fidler, I. J. (1986). Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 5(1), 29–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2942306>

- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews. Cancer*, 3(6), 453–458. doi:10.1038/nrc1098
- Fidler, I. J. (2006). Models for spontaneous metastasis. *Cancer Research*, 66(19), 9787. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2396
- Fidler, I. J., & Bucana, C. (1977). Mechanism of Tumor Cell Resistance to Lysis by Syngeneic Lymphocytes Mechanism of Tumor Cell Resistance to Lysis by Syngeneic. *Cancer Research*, 37(NOVEMBER), 3945–3956.
- Fidler, I. J., Darnell, J. H., & Budmen, M. B. (1976). Tumoricidal Properties of Mouse Macrophages Activated with Mediators from Rat Lymphocytes Stimulated with Concanavalin A Tumoricidal Properties of Mouse Macrophages Activated with Mediators from Rat Lymphocytes Stimulated with Concanavalin A1. *Cancer Research*, 36, 3608–3615.
- Fidler, I. J., & Hart, I. R. (1982). Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science (New York, N.Y.)*, 217(4564), 998–1003. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7112116>
- Fidler, I. J., & Kripke, M. (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, 197(4306), 893–895. doi:10.1126/science.887927
- Fidler, I. J., Naito, S., & Pathak, S. (1990). Orthotopic implantation is essential for the selection, growth and metastasis of human renal cell cancer in nude mice [corrected]. *Cancer Metastasis Reviews*, 9(2), 149–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2253314>
- Fidler, I. J., & Nicolson, G. L. (1976). Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 57(5), 1199–1202. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1003551>
- Fidler, I. J., & Nicolson, G. L. (1977). Fate of Recirculating B16 Melanoma Metastatic Variant Cells in Parabolic Syngeneic Recipients: Brief Communication. *J Natl Cancer Inst*, 58(6), 1867–1872. doi:10.1093/jnci/58.6.1867
- Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, a, Hu, M., ... Groudine, M. (1995). Targeted deletion of 5’HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes & Development*, 9(18), 2203–2213. doi:10.1101/gad.9.18.2203
- Filipazzi, P., Bürdek, M., Villa, A., Rivoltini, L., & Huber, V. (2012). Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Seminars in Cancer Biology*, 22(4), 342–349. doi:10.1016/j.semcancer.2012.02.005
- Finger, E. C., & Giaccia, A. J. (2010). Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(2), 285–93. doi:10.1007/s10555-010-9224-5
- Fischer, C., Jonckx, B., Mazzone, M., Zacchigna, S., Loges, S., Pattarini, L., ... Carmeliet, P. (2007). Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*, 131(3), 463–75. doi:10.1016/j.cell.2007.08.038
- Fischer, M., Yen, W. C., Kapoun, A. M., Wang, M., O’Young, G., Lewicki, J., ... Hoey, T. (2011). Anti-DLL4 inhibits growth and reduces tumor-initiating cell frequency in colorectal tumors with oncogenic KRAS mutations. *Cancer Research*, 71(15), 1520–1525. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2817
- Fisher, E. R., & Fisher, B. (1967). Recent observations on concepts of metastasis. *Archives of Pathology*, 83(4), 321–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6022744>
- Fodstad, O., & Kjønneksen, I. (1994). Microenvironment revisited: time for reappraisal of some prevailing concepts of cancer metastasis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 56(1), 23–8. doi:10.1002/jcb.240560106
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182–1186. doi:10.1056/NEJM197111182852108
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature*

- Medicine*, 1(1), 27–31. doi:10.1038/nm0195-27
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 29(6 Suppl 16), 15–18. doi:10.1053/sonc.2002.37263
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(4), 273–86. doi:10.1038/nrd2115
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., & Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376(6535), 66–70. doi:10.1038/376066a0
- Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., & Carmeliet, P. (2009). Regulation of Angiogenesis by Oxygen and Metabolism. *Developmental Cell*, 16(2), 167–179. doi:10.1016/j.devcel.2009.01.003
- Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P., & Kerbel, R. S. (2011). Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nature Reviews. Cancer*, 11(2), 135–41. doi:10.1038/nrc3001
- Francia, G., Emmenegger, U., Lee, C. R., Shaked, Y., Folkins, C., Mossoba, M., ... Kerbel, R. S. (2008). Long-term progression and therapeutic response of visceral metastatic disease non-invasively monitored in mouse urine using beta-human choriogonadotropin secreting tumor cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(10), 3452–3459. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0200
- Franco, M., Muratori, C., Corso, S., Tenaglia, E., Bertotti, A., Capparuccia, L., ... Tamagnone, L. (2010). The tetraspanin CD151 is required for Met-dependent signaling and tumor cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 38756–64. doi:10.1074/jbc.M110.145417
- Frese, K. K., & Tuveson, D. a. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews. Cancer*, 7(9), 645–58. doi:10.1038/nrc2192
- Fukumura, D., Duda, D. G., Munn, L. L., & Jain, R. K. (2010). Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. *Microcirculation*, 17(3), 206–25. doi:10.1111/j.1549-8719.2010.00029.x
- Fukumura, D., & Jain, R. K. (2007). Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(4), 937–49. doi:10.1002/jcb.21187
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.-C., Lu, N., ... Seed, B. (1998). Tumor Induction of VEGF Promoter Activity in Stromal Cells. *Cell*, 94(6), 715–725. doi:10.1016/S0092-8674(00)81731-6
- Funahashi, Y., Hernandez, S. L., Das, I., Ahn, A., Huang, J., Vorontchikhina, M., ... Kitajewski, J. (2008). A notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis. *Cancer Research*, 68(12), 4727–35. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6499
- Funahashi, Y., Shawber, C. J., Vorontchikhina, M., Sharma, A., Outtz, H. H., & Kitajewski, J. (2010). Notch regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1. *Journal of Angiogenesis Research*, 2(1), 3. doi:10.1186/2040-2384-2-3
- Funakoshi, T., Tachibana, I., Hoshida, Y., Kimura, H., Takeda, Y., Kijima, T., ... Kawase, I. (2003). Expression of tetraspanins in human lung cancer cells: frequent downregulation of CD9 and its contribution to cell motility in small cell lung cancer. *Oncogene*, 22(5), 674–87. doi:10.1038/sj.onc.1206106
- Furukawa, T., Kubota, T., Watanabe, M., Kitajima, M., & Hoffman, R. M. (1993). A novel “patient-like” treatment model of human pancreatic cancer constructed using orthotopic transplantation of histologically intact human tumor tissue in nude mice. *Cancer Research*, 53(13), 3070–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8319214>
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews. Immunology*, 12(4), 253–68. doi:10.1038/nri3175

- Gacche, R. N., & Meshram, R. J. (2014). Angiogenic factors as potential drug target: Efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1846(1), 161–179. doi:10.1016/j.bbcan.2014.05.002
- Gale, N. W., Dominguez, M. G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D. M., ... Yancopoulos, G. D. (2004). Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 15949–54. doi:10.1073/pnas.0407290101
- Gallahan, D., Jhappan, C., Robinson, G., Hennighausen, L., Sharp, R., Kordon, E., ... Smith, G. H. (1996). Expression of a truncated Int3 gene in developing secretory mammary epithelium specifically retards lobular differentiation resulting in tumorigenesis. *Cancer Research*, 56(8), 1775–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620493>
- Garcia, A., & Kandel, J. J. (2012). Notch: A key regulator of tumor angiogenesis and metastasis. *Histology and Histopathology*, 27, 151–156.
- Garcia, E. L., & Mills, A. A. (2002). Getting around lethality with inducible Cre-mediated excision. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13(2), 151–158. doi:10.1016/S1084-9521(02)00019-8
- Garofalo, A., Chirivi, R. G., Scanziani, E., Mayo, J. G., Vecchi, A., & Giavazzi, R. (1993). Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice. *Invasion & Metastasis*, 13(2), 82–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225855>
- Gattoni-Celli, S., Byers, R. H., Calorini, L., & Ferrone, S. (1993). Organ-Specific Metastases in Melanoma: Experimental Animal Models. *Pigment Cell Research*, 6, 381–384.
- Gautam, A., Densmore, C. L., Melton, S., Golunski, E., & Waldrep, J. C. (2002). Aerosol delivery of PEI-p53 complexes inhibits B16-F10 lung metastases through regulation of angiogenesis. *Cancer Gene Therapy*, 9(1), 28–36. doi:10.1038/sj.cgt.7700405
- Gautam, A., Waldrep, J. C., Densmore, C. L., Koshkina, N., Melton, S., Roberts, L., ... Knight, V. (2002). Growth inhibition of established B16-F10 lung metastases by sequential aerosol delivery of p53 gene and 9-nitrocamptothecin. *Gene Therapy*, 9(5), 353–357. doi:10.1038/sj.gt.3301662
- Geisert, E. E., Williams, R. W., Geisert, G. R., Fan, L., Asbury, A. M., Maecker, H. T., ... Levy, S. (2002). Increased brain size and glial cell number in CD81-null mice. *The Journal of Comparative Neurology*, 453(April), 22–32. doi:10.1002/cne.10364
- Genentech Inc. (2016). Avastin (bevacizumab). *important safety information*. Retrieved February 21, 2016, from http://www.avastin-hcp.com/about-avastin/safety#important_safety_information
- Gerbaud, C., Fournier, P., Blanc, H., Aigle, M., Heslot, H., & Guerineau, M. (1979). High frequency of yeast transformation by plasmids carrying part or entire 2-micron yeast plasmid. *Gene*, 5(3), 233–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/381104>
- Gerber, H., & Ferrara, N. (2005). Pharmacology and Pharmacodynamics of Bevacizumab as Monotherapy or in Combination with Cytotoxic Therapy in Preclinical Studies Pharmacology and Pharmacodynamics of Bevacizumab as Monotherapy or in Combination with Cytotoxic Therapy in Preclinical Studies. *Cancer Research*, 65(3), 671–680.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., & Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer*, 31(1), 13–20. doi:10.1002/ijc.2910310104
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., ... Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal of Cell Biology*, 161, 1163–1177. doi:10.1083/jcb.200302047
- Gesierich, S., Berezovskiy, I., Ryschich, E., & Zöller, M. (2006). Systemic induction of the

- angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. *Cancer Research*, 66(15), 7083–7094. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0391
- Gesierich, S., Paret, C., Hildebrand, D., Weitz, J., Zraggen, K., Schmitz-Winnenthal, F. H., ... Zöller, M. (2005). Colocalization of the tetraspanins, CO-029 and CD151, with integrins in human pancreatic adenocarcinoma: impact on cell motility. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(8), 2840–52. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1935
- Geudens, I., & Gerhardt, H. (2011). Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development*, 138, 4569–4583. doi:10.1242/dev.062323
- Ghajar, C. M., Peinado, H., Mori, H., Matei, I. R., Evason, K. J., Brazier, H., ... Bissell, M. J. (2013). The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nature Cell Biology*, 15(7), 807–17. doi:10.1038/ncb2767
- Giavazzi, R., & Garofalo, A. (2001). Syngeneic Murine Metastasis Models. In S. A. Brooks & U. Schumacher (Eds.), *Metastasis Research Protocols, Vol.2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo* (pp. 223–229). humana Press.
- Gilkes, D. M., Semenza, G. L., & Wirtz, D. (2014). Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 14(6), 430–9. doi:10.1038/nrc3726
- Gingrich, J. R., Barrios, R. J., Foster, B. a, & Greenberg, N. M. (1999). Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2(2), 70–75. doi:10.1038/sj.pcan.4500296
- Gingrich, J. R., Barrios, R. J., Morton, R. A., Boyce, B. F., Demayo, F. J., Finegold, M. J., ... Greenbere, N. M. (1996). Metastatic Prostate Cancer in a Transgenic Mouse. *Cancer Research*, 56, 4096–4102.
- Giovanella, B. C., & Fogh, J. (1985). The nude mouse in cancer research. *Advances in Cancer Research*, 44, 69–120. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3898740>
- Glickman, L. T., Domanski, L. M., Maguire, T. G., Dubielzig, R. R., & Churg, A. (1983). Mesothelioma in pet dogs associated with exposure of their owners to asbestos. *Environmental Research*, 32(2), 305–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6641667>
- Goel, S., Duda, D. G., Xu, L., Munn, L. L., Boucher, Y., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiological Reviews*, 91, 1071–1121. doi:10.1152/physrev.00038.2010
- Goel, S., Wong, A. H., & Jain, R. K. (2012). Vascular Normalization as a Therapeutic Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, 1–24. doi:10.1101/cshperspect.a006486
- Gohongi, T., Fukumura, D., Boucher, Y., Yun, C.-O., Soff, G. A., Compton, C., ... Jain, R. K. (1999). Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth: involvement of transforming growth factor beta. *Nature*, 5(10), 1203–1208.
- Goldhirsch, A., Ingle, J. N., Gelber, R. D., Coates, A. S., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2009). Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 20(8), 1319–29. doi:10.1093/annonc/mdp322
- Gonzalez, F. J., & Kimura, S. (2001). Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. *Mutation Research*, 477(1-2), 79–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11376689>
- Gory, B. S., Vernet, M., Laurent, M., Dejana, E., Dalmon, J., & Huber, P. (1999). The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood*, 93(1), 184–192.
- Goss, P. E., & Chambers, A. F. (2010). Does tumour dormancy offer a therapeutic target? *Nature Reviews. Cancer*, 10(12), 871–7. doi:10.1038/nrc2933
- Gossen, J. A., Molijn, A. C., Douglas, G. R., & Vijg, J. (1992). Application of galactose-sensitive E. coli strains hosts for LacZ- plasmids as selective. *Nucleic Acids Research*,

- 20(12), 3254–3254.
- Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serflingt, E., & Kemler, R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(December), 9065–9069.
- Gould, S., Westwood, F. R., Curwen, J. O., Ashton, S. E., Roberts, D. W., Lovick, S. C., & Ryan, A. J. (2007). Effect of pretreatment with atenolol and nifedipine on ZD6126-induced cardiac toxicity in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(22), 1724–8. doi:10.1093/jnci/djm202
- Greenberg, N. M., DeMayo, F., Finegold, M. J., Medina, D., Tilley, W. D., Aspinall, J. O., ... Rosen, J. M. (1995). Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3439–3443.
- Griffioen, A. W., & Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews*, 52(2), 237–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835101>
- Günschmann, C., Chiticariu, E., Garg, B., Hiz, M. M., Mostmans, Y., Wehner, M., & Scharfenberger, L. (2014). Transgenic Mouse Technology in Skin Biology: Inducible Gene Knockout in Mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 134, e22. doi:10.1038/jid.2014.213
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679–95. doi:10.1016/j.cell.2006.11.001
- Gupta, G. P., Nguyen, D. X., Chiang, A. C., Bos, P. D., Kim, J. Y., Nadal, C., ... Massagué, J. (2007). Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*, 446(7137), 765–70. doi:10.1038/nature05760
- Gupta, P. B., Proia, D., Cingoz, O., Weremowicz, J., Naber, S. P., Weinberg, R. A., & Kuperwasser, C. (2007). Systemic stromal effects of estrogen promote the growth of estrogen receptor-negative cancers. *Cancer Research*, 67(5), 2062–71. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3895
- Gupta, S., Ahmad, N., Marengo, S. R., MacLennan, G. T., Greenberg, N. M., & Mukhtar, H. (2000). Chemoprevention of prostate carcinogenesis by alpha-difluoromethylornithine in TRAMP mice. *Cancer Research*, 60(18), 5125–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11016639>
- Gurney, A., & Hoey, T. (2011). Anti-DLL4, a cancer therapeutic with multiple mechanisms of action. *Vasc Cell*, 3, 18. doi:10.1186/2045-824X-3-18
- Gustafsson, M. V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., ... Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Developmental Cell*, 9(5), 617–28. doi:10.1016/j.devcel.2005.09.010
- Gustafsson, E., Brakebusch, C., Hietanen, K., & Fässler, R. (2001). Tie-1-directed expression of Cre recombinase in endothelial cells of embryoid bodies and transgenic mice. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 4), 671–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171372>
- Guy, C. T., Cardiff, R. D., & Muller, W. J. (1992). Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Molecular and Cellular Biology*, 12(3), 954–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=369527&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Guy, C. T., & Cardoso, G. (2001). Transgenic Animal Models. In S. A. Brooks & U. Schumacher (Eds.), *Metastasis Research Protocols, Vol.2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo* (1st ed., pp. 231–249). Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- GXD. (2010). MGI:4828963. Retrieved April 17, 2015, from <http://www.informatics.jax.org/assay/MGI:4828963>
- GXD. (2011). MGI:4881462. Retrieved April 17, 2015, from

<http://www.informatics.jax.org/assay/MGI:4881462>

- H., L., M., W., R., S., Fields J., Rojanasopondist P., F., S., & Fiering S. (2015). In situ vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer. *Nature Nanotechnology*, in press (December), DOI: 10.1038/nnano.2015.292. doi:10.1038/nnano.2015.292
- H., H., K., M., M., O., A., U., N., K., Jk., Y., ... T., C. (2005). High level of endothelial cell-specific gene expression by a combination of the 5' flanking region and the 5' half of the first intron of the VE-cadherin gene. *Blood*, 105(12), 4657–4663. doi:10.1182/blood-2004-09-3554.BLOOD
- Hahn, K. A., Bravo, L., Adams, W. H., & Frazier, D. L. (1994). Naturally occurring tumors in dogs as comparative models for cancer therapy research. *In Vivo*, 8(1), 133–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8054503>
- Hainaud, P., Contrerès, J.-O., Villemain, A., Liu, L.-X., Plouët, J., Tobelem, G., & Dupuy, E. (2006). The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. *Cancer Research*, 66(17), 8501–10. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4226
- Haining, E. J., Yang, J., Bailey, R. L., Khan, K., Collier, R., Tsai, S., ... Tomlinson, M. G. (2012). The TspanC8 subgroup of tetraspanins interacts with A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulates its maturation and cell surface expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39753–65. doi:10.1074/jbc.M112.416503
- Haller, B. K., ve, A. B. aring, Wallgard, E., Roswall, P., Sunkari, V. G., Mattson, U., ... Pietras, K. (2010). Therapeutic efficacy of a DNA vaccine targeting the endothelial tip cell antigen delta-like ligand 4 in mammary carcinoma. *Oncogene*, 29(30), 4276–4286. doi:10.1038/onc.2010.176
- Hamzah, J., Jugold, M., Kiessling, F., Rigby, P., Manzur, M., Marti, H. H., ... Ganss, R. (2008). Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature*, 453(7193), 410–414. doi:10.1038/nature06868
- Han, K. S., Raven, P. A., Frees, S., Gust, K., Fazli, L., Ettinger, S., ... So, A. I. (2015). Cellular Adaptation to VEGF-Targeted Antiangiogenic Therapy Induces Evasive Resistance by Overproduction of Alternative Endothelial Cell Growth Factors in Renal Cell Carcinoma. *Neoplasia*, 17(11), 805–816. doi:10.1016/j.neo.2015.11.001
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic β -cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*, 315(6015), 115–122. doi:10.1038/315115a0
- Hanahan, D. (1988). Dissecting multistep tumorigenesis in transgenic mice. *Annual Review of Genetics*, 22, 479–519. doi:10.1146/annurev.ge.22.120188.002403
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–22. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718>
- Hanahan, D., Wagner, E. F., & Palmiter, R. D. (2007). The origins of oncomice: A history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. *Genes and Development*, 21(18), 2258–2270. doi:10.1101/gad.1583307
- Hann, B., & Balmain, A. (2001). Building “validated” mouse models of human cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 13(6), 778–784. doi:S0955-0674(00)00283-0 [pii]
- Hannah, M. J., Williams, R., Kaur, J., Hewlett, L. J., & Cutler, D. F. (2002). Biogenesis of Weibel–Palade bodies. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13, 313–324. doi:10.1016/S1084
- Hansen-Algenstaedt, N., Stoll, B. R., Padera, T. P., Dolmans, D. E., Hicklin, D. J., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2000). Tumor oxygenation in hormone-dependent tumors during

- vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy. *Cancer Research*, 60(16), 4556–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969807>
- Hansma, A. H. G., Broxterman, H. J., van der Horst, I., Yuana, Y., Boven, E., Giaccone, G., ... Hoekman, K. (2005). Recombinant human endostatin administered as a 28-day continuous intravenous infusion, followed by daily subcutaneous injections: a phase I and pharmacokinetic study in patients with advanced cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16(10), 1695–701. doi:10.1093/annonc/mdi318
- Harrington, L. S., Sainson, R. C. A., Williams, C. K., Taylor, J. M., Shi, W., Li, J. L., & Harris, A. L. (2008). Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvascular Research*, 75, 144–154. doi:10.1016/j.mvr.2007.06.006
- Harris, K. A., Harney, E., & Small, E. J. (2002). Liposomal doxorubicin for the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Clinical Prostate Cancer*, 1(1), 37–41. doi:10.3816/CGC.2002.n.005
- Hart, I. R. (1979). The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *The American Journal of Pathology*, 97(3), 587–600.
- Hart, I. R. (1982). “Seed and soil” revisited: mechanisms of site-specific metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 1(1), 5–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6764375>
- Hartford, A. C., Gohongi, T., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2000). Irradiation of a primary tumor, unlike surgical removal, enhances angiogenesis suppression at a distal site: Potential role of host-tumor interaction. *Cancer Research*, 60(8), 2128–2131.
- Hashida, H., Takabayashi, A., Tokuhara, T., Hattori, N., Taki, T., Hasegawa, H., ... Miyake, M. (2003). Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *British Journal of Cancer*, 89(1), 158–67. doi:10.1038/sj.bjc.6601015
- Haskill, J. S. (1981). Adriamycin-activated Macrophages as Tumor Growth Inhibitors. *Cancer Research*, 41, 3852–3856.
- Hasty, P., Abuin, A., & Bradley, A. (2000). Gene targeting, principles, and practice in mammalian cells. In A. L. Joyner (Ed.), *Gene Targeting: a practical approach* (2nd ed., pp. 1–35). Oxford University Press.
- Hawkins, W. G., Gold, J. S., Blachere, N. E., Bowne, W. B., Hoos, A., Lewis, J. J., & Houghton, A. N. (2002). Xenogeneic DNA immunization in melanoma models for minimal residual disease. *The Journal of Surgical Research*, 102(2), 137–43. doi:10.1006/jsre.2001.6302
- He, B., Liu, L., Cook, G. A., Grgurevich, S., Jennings, L. K., & Zhang, X. A. (2005). Tetraspanin CD82 attenuates cellular morphogenesis through down-regulating integrin alpha6-mediated cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3346–54. doi:10.1074/jbc.M406680200
- Heinke, J., Patterson, C., & Moser, M. (2012). Life is a pattern: vascular assembly within the embryo. *Frontiers in Bioscience*, 4, 2269–2288.
- Hellström, M., Phng, L.-K., & Gerhardt, H. (2007). VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adhesion & Migration*, 1(3), 133–136. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2634014&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hellström, M., Phng, L.-K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., ... Betsholtz, C. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 445(February), 2–6. doi:10.1038/nature05571
- Hemler, M. E. (2001). Specific tetraspanin functions. *Journal of Cell Biology*, 155(7), 1103–1107. doi:10.1083/jcb.200108061
- Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual Review of Cell and*

- Developmental Biology*, 19, 397–422. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153609
- Hemler, M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(10), 801–11. doi:10.1038/nrm1736
- Hemler, M. E. (2014). Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nature Reviews Cancer*, 14, 49–60. doi:10.1038/nrc3640
- Hemming, M. L., Elias, J. E., Gygi, S. P., & Selkoe, D. J. (2008). Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biology*, 6(10), e257. doi:10.1371/journal.pbio.0060257
- Hendrickson, E. A. (1993). The SCID mouse: relevance as an animal model system for studying human disease. *The American Journal of Pathology*, 143(6), 1511–22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887268&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Herbert, S. P., & Stainier, D. Y. R. (2011). Molecular control of endothelial cell behavior during blood vessel morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(9), 551–564. doi:10.1038/nrm3176
- Herlevsen, M., Schmidt, D.-S., Miyazaki, K., & Zöller, M. (2003). The association of the tetraspanin D6.1A with the alpha6beta4 integrin supports cell motility and liver metastasis formation. *Journal of Cell Science*, 116, 4373–4390. doi:10.1242/jcs.00760
- Heyn, C., Ronald, J. A., Ramadan, S. S., Snir, J. A., Barry, A. M., MacKenzie, L. T., ... Foster, P. J. (2006). In vivo MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 56(5), 1001–10. doi:10.1002/mrm.21029
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 11(9), 1026–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764001>
- Hoek, K., Rimm, D. L., Williams, K. R., Zhao, H., Ariyan, S., Lin, A., ... Halaban, R. (2004). Expression Profiling Reveals Novel Pathways in the Transformation of Melanocytes to Melanomas. *Cancer Research*, 64(12), 5270–5282. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0731
- Hoey, T., Yen, W. C., Axelrod, F., Basi, J., Donigian, L., Dylla, S., ... Gurney, A. (2009). DLL4 Blockade Inhibits Tumor Growth and Reduces Tumor-Initiating Cell Frequency. *Cell Stem Cell*, 5(2), 168–177. doi:10.1016/j.stem.2009.05.019
- Hoffman, R. M. (1999). Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Investigational New Drugs*, 17(4), 343–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759402>
- Hofmann, J. J., & Iruela-Arispe, M. L. (2007). Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circulation Research*, 100(11), 1556–68. doi:10.1161/01.RES.0000266408.42939.e4
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., & Lacy, E. (1994). Developmental Genetics and Embryology of the mouse: Past, Present, and Future. In B. Hogan, R. Beddington, F. Constantini, & E. Lacy (Eds.), *Manipulating the Mouse Embryo - a laboratory manual* (Second., pp. 1–18). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., & Lacy, E. (1994a). Mouse coat color and its genetics. In *Manipulating the Mouse Embryo - a laboratory manual* (2nd ed., pp. 106–113). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., & Lacy, E. (1994b). Recovery, Culture and Transfer of Embryos. In B. Hogan, R. Beddington, F. Constantini, & E. Lacy (Eds.), *Manipulating the Mouse Embryo - a laboratory manual* (Second., pp. 127–188). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Holden, S. A., Emi, Y., Kakeji, Y., Northey, D., & Teicher, B. A. (1997). Host distribution and

- response to antitumor alkylating agents of EMT-6 tumor cells from subcutaneous tumor implants. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 40(1), 87–93. doi:10.1007/s002800050631
- Holleran, J. L., Miller, C. J., Edgehouse, N. L., Pretlow, T. P., & Culp, L. A. (2002). Differential experimental micrometastasis to lung, liver, and bone with lacZ-tagged CWR22R prostate carcinoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 19(1), 17–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11918079>
- Holmgren, L., O'Reilly, M. S., & Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine*, 1, 149–153. doi:10.1038/nm0295-149
- Hori, H., Yano, S., Koufuji, K., Takeda, J., & Shirouzu, K. (2004). CD9 expression in gastric cancer and its significance. *The Journal of Surgical Research*, 117(2), 208–15. doi:10.1016/j.jss.2004.01.014
- Hozumi, K., Mailhos, C., Negishi, N., Hirano, K., Yahata, T., Ando, K., ... Habu, S. (2008). Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(11), 2507–13. doi:10.1084/jem.20080134
- Hu, M. C.-T., & Davidson, N. (1987). The inducible lac operator-repressor system is functional in mammalian cells. *Cell*, 48(4), 555–566.
- Hu, X.-B., Feng, F., Wang, Y.-C., Wang, L., He, F., Dou, G.-R., ... Han, H. (2009). Blockade of Notch signaling in tumor-bearing mice may lead to tumor regression, progression, or metastasis, depending on tumor cell types. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 11(1), 32–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2606116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hu, Y.-Y., Zheng, M.-H., Zhang, R., Liang, Y.-M., & Han, H. (2012). Notch signaling pathway and cancer metastasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 727, 186–98. doi:10.1007/978-1-4614-0899-4_14
- Huang, Q. B., Ma, X., Li, H. Z., Ai, Q., Liu, S. W., Zhang, Y., ... Zhang, X. (2014). Endothelial Delta-like 4 (DLL4) promotes renal cell carcinoma hematogenous metastasis. *Oncotarget*, 5(10), 3066–75. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4102792&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Huang, S., Tian, H., Chen, Z., Yu, T., & Xu, A. (2010). The evolution of vertebrate tetraspanins: gene loss, retention, and massive positive selection after whole genome duplications. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 306. doi:10.1186/1471-2148-10-306
- Huang, X., Molema, G., King, S., Watkins, L., Edgington, T. S., & Thorpe, P. E. (1997). Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5299), 547–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8999802>
- Huang, Y., Song, N., Ding, Y., Yuan, S., Li, X., Cai, H., ... Luo, Y. (2009). Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis. *Cancer Research*, 69(19), 7529–37. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4382
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., HeiM, W., ... Kabbinavar, F. (2004). Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer Herbert. *New England Journal of Medicine*, 350(23), 2335–42.
- Huss, W. J., Barrios, R. J., Foster, B. A., & Greenberg, N. M. (2003). Differential expression of specific FGF ligand and receptor isoforms during angiogenesis associated with prostate cancer progression. *The Prostate*, 54(1), 8–16. doi:10.1002/pros.10163
- Huss, W. J., Hanrahan, C. F., Barrios, R. J., Simons, J. W., & Greenberg, N. M. (2001). Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Research*, 61(6), 2736–43. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289156>

- Ichihara, E., Kiura, K., & Tanimoto, M. (2011). Targeting angiogenesis in cancer therapy. *Acta Medica Okayama*, 65(6), 353–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189475>
- Ilan, N., Cheung, L., Pinter, E., & Madri, J. a. (2000). Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21435–21443. doi:10.1074/jbc.M001857200
- Imbimbo, B. P. (2008). Therapeutic potential of gamma-secretase inhibitors and modulators. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(1), 54–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220933>
- Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H., Baffert, F., Haskell, A., Baluk, P., ... McDonald, D. M. (2004). Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *The American Journal of Pathology*, 165(1), 35–52. doi:10.1016/S0002-9440(10)63273-7
- Indraccolo, S., Minuzzo, S., Masiero, M., Pusceddu, I., Persano, L., Moserle, L., ... Amadori, A. (2009). Cross-talk between tumor and endothelial cells involving the Notch3-Dll4 interaction marks escape from tumor dormancy. *Cancer Research*, 69(4), 1314–23. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2791
- Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H., & Folkman, J. (1990). Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*, 348(6301), 555–7. doi:10.1038/348555a0
- International Mouse Phenotype Consortium. (2015). Gene: Tspan18. *release 3.0*. Retrieved April 17, 2015, from <http://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1917186#section-associations>
- Iwakawa, M., Ando, K., Ohkawa, H., Koike, S., & Chen, Y. J. (1994). A murine model for bone marrow metastasis established by an i.v. injection of C-1300 neuroblastoma in A/J mice. *Clinical & Experimental Metastasis*, 12(3), 231–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8194198>
- Iwasaki, T., Takeda, Y., Maruyama, K., Yokosaki, Y., Tsujino, K., Tetsumoto, S., ... Kumanogoh, A. (2013). Deletion of tetraspanin CD9 diminishes lymphangiogenesis in vivo and in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2118–31. doi:10.1074/jbc.M112.424291
- Jacks, T. (1996). Tumor suppressor gene mutations in mice. *Annu Rev Genet*, 30(73), 603–636. doi:10.1146/annurev.genet.30.1.603
- Jackson, P., Marreiros, A., & Russell, P. J. (2005). KAI1 tetraspanin and metastasis suppressor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(3), 530–534. doi:10.1016/j.biocel.2004.08.009
- Jain, R. K. (1988). Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Research*, 48(10), 2641–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3282647>
- Jain, R. K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature Medicine*, 7(9), 987–989. doi:10.1038/nm0901-987
- Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5706), 58–62. doi:10.1126/science.1104819
- Jain, R. K. (2014). Antiangiogenesis Strategies Revisited: From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia. *Cancer Cell*, 26(5), 605–622. doi:10.1016/j.ccell.2014.10.006
- Jain, R. K. (2014). Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell*, 26(5), 605–622. doi:10.1016/j.ccell.2014.10.006
- Jain, R. K., & Carmeliet, P. (2012). SnapShot: Tumor Angiogenesis. *Cell*, 149(6), 1408–1408.e1. doi:10.1016/j.cell.2012.05.025

- Jain, R. K., Duda, D. G., Clark, J. W., & Loeffler, J. S. (2006). Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 3(1), 24–40. doi:10.1038/ncponc0403
- Jain, R. K., Safabakhsh, N., Sckell, A., Chen, Y., Jiang, P., Benjamin, L., ... Keshet, E. (1998). Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor: role of vascular endothelial growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10820–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jakobsson, L., Franco, C. a, Bentley, K., Collins, R. T., Ponsioen, B., Aspalter, I. M., ... Gerhardt, H. (2010). Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature Cell Biology*, 12(10), 943–953. doi:10.1038/ncb2103
- Jean, C., Chen, X. L., Nam, J. O., Tancioni, I., Uryu, S., Lawson, C., ... Schlaepfer, D. D. (2014). Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *Journal of Cell Biology*, 204(2), 247–263. doi:10.1083/jcb.201307067
- Jee, B. K., Park, K. M., Surendran, S., Lee, W. K., Han, C. W., Kim, Y. S., & Lim, Y. (2006). KAI1/CD82 suppresses tumor invasion by MMP9 inactivation via TIMP1 up-regulation in the H1299 human lung carcinoma cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(2), 655–661. doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.153
- Jenkins, D. E., Oei, Y., Hornig, Y. S., Yu, S. F., Dusich, J., Purchio, T., & Contag, P. R. (2003). Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, 20(8), 733–744. doi:10.1023/B:CLIN.0000006815.49932.98
- Jhappan, C., Gallahan, D., Stahle, C., Chu, E., Smith, G. H., Merlino, G., & Callahan, R. (1992). Expression of an activated Notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. *Genes & Development*, 6(3), 345–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372276>
- Jin, Y., Kaluza, D., & Jakobsson, L. (2014). VEGF, Notch and TGFβ/BMPs in regulation of sprouting angiogenesis and vascular patterning. *Biochemical Society Transactions*, 42(6), 1576–83. doi:10.1042/BST20140231
- Johansen, P. B. (1981). Doxorubicin pharmacokinetics after intravenous and intraperitoneal administration in the nude mouse. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 5, 267–270. doi:10.1007/BF00434396
- Juan, T.-Y., Roffler, S. R., Hou, H.-S., Huang, S.-M., Chen, K.-C., Leu, Y.-L., ... Cha, T.-L. (2009). Antiangiogenesis targeting tumor microenvironment synergizes glucuronide prodrug antitumor activity. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(14), 4600–11. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0090
- Jubb, A. M., Soilleux, E. J., Turley, H., Steers, G., Parker, A., Low, I., ... Harris, A. L. (2010). Expression of vascular notch ligand delta-like 4 and inflammatory markers in breast cancer. *The American Journal of Pathology*, 176(4), 2019–28. doi:10.2353/ajpath.2010.090908
- Jubb, A. M., Turley, H., Moeller, H. C., Steers, G., Han, C., Li, J.-L., ... Harris, A. L. (2009). Expression of delta-like ligand 4 (Dll4) and markers of hypoxia in colon cancer. *British Journal of Cancer*, 101(10), 1749–57. doi:10.1038/sj.bjc.6605368
- Jung, K.-K., Liu, X.-W., Chirco, R., Fridman, R., & Kim, H.-R. C. (2006). Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *The EMBO Journal*, 25(17), 3934–3942. doi:10.1038/sj.emboj.7601281
- Junge, H. J., Yang, S., Burton, J. B., Paes, K., Shu, X., French, D. M., ... Ye, W. (2009). TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-

- induced FZD4/beta-catenin signaling. *Cell*, 139(2), 299–311. doi:10.1016/j.cell.2009.07.048
- Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Molecular Cell*, 30, 393–402. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.009
- Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., ... Kudo, a. (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature Genetics*, 24(march), 279–282. doi:10.1038/73502
- Kalén, M., Heikura, T., Karvinen, H., Nitzsche, A., Weber, H., Esser, N., ... Hellström, M. (2011). Gamma-secretase inhibitor treatment promotes VEGF-A-driven blood vessel growth and vascular leakage but disrupts neovascular perfusion. *PloS One*, 6(4), e18709. doi:10.1371/journal.pone.0018709
- Kamba, T., Tam, B. Y. Y., Hashizume, H., Haskell, A., Sennino, B., Mancuso, M. R., ... McDonald, D. M. (2006). VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 290(2), H560–76. doi:10.1152/ajpheart.00133.2005
- Kamisasanuki, T., Tokushige, S., Terasaki, H., Khai, N. C., Wang, Y., Sakamoto, T., & Kosai, K. (2011). Targeting CD9 produces stimulus-independent antiangiogenic effects predominantly in activated endothelial cells during angiogenesis: a novel antiangiogenic therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(1), 128–35. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.068
- Kamoun, W. S., Ley, C. D., Farrar, C. T., Duyverman, A. M., Lahdenranta, J., Lacorre, D. A., ... Jain, R. K. (2009). Edema control by cediranib, a vascular endothelial growth factor receptor-targeted kinase inhibitor, prolongs survival despite persistent brain tumor growth in mice. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(15), 2542–52. doi:10.1200/JCO.2008.19.9356
- Kanetaka, K., Sakamoto, M., Yamamoto, Y., Takamura, M., Kanematsu, T., & Hirohashi, S. (2003). Possible involvement of tetraspanin CO-029 in hematogenous intrahepatic metastasis of liver cancer cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18(11), 1309–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14535989>
- Kanetaka, K., Sakamoto, M., Yamamoto, Y., Yamasaki, S., Lanza, F., Kanematsu, T., & Hirohashi, S. (2001). Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 35(5), 637–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11690710>
- Kangsamaksin, T., Murtomaki, A., Kofler, N. M., Cuervo, H., Chaudhri, R. A., Tattersall, I. W., ... Kitajewski, J. (2015). NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth. *Cancer Discovery*, 5(2), 182–197. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0650
- Kangsamaksin, T., Tattersall, I. W., & Kitajewski, J. (2014). Notch functions in developmental and tumour angiogenesis by diverse mechanisms1. *Biochemical Society Transactions*, 42(6), 1563–8. doi:10.1042/BST20140233
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., ... Lyden, D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), 820–7. doi:10.1038/nature04186
- Kaplan-Lefko, P. J., Chen, T.-M., Ittmann, M. M., Barrios, R. J., Ayala, G. E., Huss, W. J., ... Greenberg, N. M. (2003). Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. *The Prostate*, 55(3), 219–37. doi:10.1002/pros.10215
- Kapoor, A., & Figlin, R. A. (2009). Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer*, 115(16), 3618–30. doi:10.1002/encr.24409
- Kappas, N. C., Zeng, G., Chappell, J. C., Kearney, J. B., Hazarika, S., Kallianos, K. G., ... Bautch, V. L. (2008). The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and

- blood vessel branching. *Journal of Cell Biology*, 181, 847–858. doi:10.1083/jcb.200709114
- Karparkin, S., & Pearlstein, E. (1981). Role of platelets in tumor cell metastases. *Annals of Internal Medicine*, 95(5), 636–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7027860>
- Karukstis, K. K., Thompson, E. H. Z., Whiles, J. a., & Rosenfeld, R. J. (1998). Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophysical Chemistry*, 73, 249–263. doi:10.1016/S0301-4622(98)00150-1
- Kawamura, H., Li, X., Welsh, M., & Claesson-Welsh, L. (2008). VEGF Signal transduction in angiogenesis. In W. D. Figg & J. Folkman (Eds.), *Angiogenesis - An Integrative Approach From Science to Medicine* (pp. 205–216). Springer.
- Ke, Q., Bodyak, N., Rigor, D. L., Hurst, N. W., Chaplin, D. J., & Kang, P. M. (2009). Pharmacological inhibition of the hypertensive response to combretastatin A-4 phosphate in rats. *Vascular Pharmacology*, 51(5-6), 337–43. doi:10.1016/j.vph.2009.08.004
- Keith, B., Johnson, R. S., & Simon, M. C. (2012). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature Reviews. Cancer*, 12(1), 9–22. doi:10.1038/nrc3183
- Kellendonk, C. (1996). Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Research*, 24(8), 1404–1411. doi:10.1093/nar/24.8.1404
- Kendall, R. L., & Thomas, K. A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22), 10705–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=47846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kerbel, R. S. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, 21(3), 505–515. doi:10.1093/carcin/21.3.505
- Kerbel, R. S. (2003). Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biology & Therapy*, 2(4 Suppl 1). doi:213 [pii]
- Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. *The New England Journal of Medicine*, 358(19), 2039–49. doi:10.1056/NEJMra0706596
- Kerbel, R. S., Cornil, I., & Theodorescu, D. (1991). Importance of orthotopic transplantation procedures in assessing the effects of transfected genes on human tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 10(3), 201–15. doi:10.1007/BF00050792
- Kerbel, R. S., Yu, J., Tran, J., Man, S., Vitoria-Petit, A., Klement, G., ... Rak, J. (2001). Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Reviews*, 20(1-2), 79–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11831651>
- Kertesz, N., Krasnoperov, V., Reddy, R., Leshanski, L., Kumar, S. R., Zozulya, S., & Gill, P. S. (2006). The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth. *Blood*, 107(6), 2330–8. doi:10.1182/blood-2005-04-1655
- Khanna, C., & Hunter, K. (2005). Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis*, 26(3), 513–23. doi:10.1093/carcin/bgh261
- Khanna, C., Prehn, J., Yeung, C., Caylor, J., Tsokos, M., & Helman, L. (2000). An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. *Clinical & Experimental Metastasis*, 18(3), 261–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11315100>
- Khanna, C., & Vail, D. M. (2003). Targeting the lung: preclinical and comparative evaluation of anticancer aerosols in dogs with naturally occurring cancers. *Current Cancer Drug Targets*, 3(4), 265–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871057>
- Khanna, C., Wan, X., Bose, S., Cassaday, R., Olomu, O., Mendoza, A., ... Helman, L. J. (2004).

The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nature Medicine*, 10(2), 182–6. doi:10.1038/nm982

- Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W. E. F., Goldbrunner, R., Herms, J., & Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nature Medicine*, 16(1), 116–22. doi:10.1038/nm.2072
- Kiguchi, K., Kubota, T., Aoki, D., Udagawa, Y., Yamanouchi, S., Saga, M., ... Hoffman, R. M. (1998). A patient-like orthotopic implantation nude mouse model of highly metastatic human ovarian cancer. *Clinical & Experimental Metastasis*, 16(8), 751–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10211988>
- Killion, J. J., Radinsky, R., & Fidler, I. J. (1998). Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17(3), 279–284. doi:10.1023/A:1006140513233
- Kisanuki, Y. Y., Hammer, R. E., Miyazaki, J., Williams, S. C., Richardson, J. A., & Yanagisawa, M. (2001). Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Developmental Biology*, 230(2), 230–42. doi:10.1006/dbio.2000.0106
- Klein, C. A., Blankenstein, T. J. F., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N. H., & Riethmüller, G. (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet (London, England)*, 360(9334), 683–9. doi:10.1016/S0140-6736(02)09838-0
- Knoblich, K., Wang, H.-X., Sharma, C., Fletcher, A. L., Turley, S. J., & Hemler, M. E. (2014). Tetraspanin TSPAN12 regulates tumor growth and metastasis and inhibits β -catenin degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(7), 1305–14. doi:10.1007/s00018-013-1444-8
- Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., ... Radtke, F. (2008). Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(11), 2515–23. doi:10.1084/jem.20080829
- Kohl, N. E., Wilson, F. R., Mosser, S. D., Giuliani, E., deSolms, S. J., Conner, M. W., ... Lee, T. J. (1994). Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 9141–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44763&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kohno, M., Hasegawa, H., Miyake, M., Yamamoto, T., & Fujita, S. (2002). CD151 enhances cell motility and metastasis of cancer cells in the presence of focal adhesion kinase. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 97(3), 336–43. doi:10.1002/ijc.1605
- Kolber, D. L., Knisely, T. L., & Maione, T. E. (1995). Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(4), 304–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7707422>
- Koller, B. H., & Smithies, O. (1989). Inactivating the beta 2-microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(November), 8932–8935.
- Konno, H., Tanaka, T., Matsuda, I., Kanai, T., Maruo, Y., Nishino, N., ... Baba, S. (1995). Comparison of the inhibitory effect of the angiogenesis inhibitor, TNP-470, and mitomycin C on the growth and liver metastasis of human colon cancer. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 61(2), 268–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535757>
- Kontgen, F., & Stewart, C. L. (1993). Simple screening procedure to detect gene targeting events in embryonic stem cells. *Methods in Enzymology*, 225(Embryonic Stem cells and

- gene targeting), 878–890. doi:10.1097/00007890-199711150-00001
- Kopan, R. (2012). Notch signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in bBology*, 4(10). doi:10.1101/cshperspect.a011213
- Koressaar, T., & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289–1291. doi:10.1093/bioinformatics/btm091
- Kotha, J., Zhang, C., Longhurst, C. M., Lu, Y., Jacobs, J., Cheng, Y., & Jennings, L. K. (2009). Functional relevance of tetraspanin CD9 in vascular smooth muscle cell injury phenotypes: A novel target for the prevention of neointimal hyperplasia. *Atherosclerosis*, 203, 377–386. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.036
- Kouroussis, C., Androulakis, N., Vamvakas, L., Kalykaki, A., Spiridonakou, S., Kentepozidis, N., ... Georgoulas, V. (2005). Phase I study of weekly docetaxel and liposomal doxorubicin in patients with advanced solid tumors. *Oncology*, 69(3), 202–207. doi:10.1159/000087908
- Krueger, J., Liu, D., Scholz, K., Zimmer, A., Shi, Y., Klein, C., ... le Noble, F. (2011). Flt1 acts as a negative regulator of tip cell formation and branching morphogenesis in the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)*, 138, 2111–2120. doi:10.1242/jcs.091983
- Kubota, T. (1994). Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 56(1), 4–8. doi:10.1002/jcb.240560103
- Kuchnio, A., Moens, S., Bruning, U., Dewerchin, M., Mazzone, M., Carmeliet, P., ... Thienpont, B. (2015). The Cancer Cell Oxygen Sensor PHD2 Promotes Metastasis via Activation of Cancer-Associated Article The Cancer Cell Oxygen Sensor PHD2 Promotes Metastasis via Activation of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Reports*, 12, 992–1005. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.010
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., & Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5229), 1427–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7660125
- Kuhnert, F., Chen, G., Coetzee, S., Thambi, N., Hickey, C., Shan, J., ... Thurston, G. (2015). Dll4 Blockade in Stromal Cells Mediates Antitumor Effects in Preclinical Models of Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 75(19), 4086–4096. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3773
- Kuhnert, F., Kirshner, J. R., & Thurston, G. (2011). Dll4-Notch signaling as a therapeutic target in tumor angiogenesis. *Vascular Cell*, 3(1), 20. doi:10.1186/2045-824X-3-20
- Kumari, S., V, G. D., Badana, A., & Ramesh, V. (2015). CD151 — A Striking Marker for Cancer Therapy. *Biomarkers in Cancer*, 7, 7–11. doi:10.4137/BIC.S21847
- Kusukawa, J., Ryu, F., Kameyama, T., & Mekada, E. (2001). Reduced expression of CD9 in oral squamous cell carcinoma: CD9 expression inversely related to high prevalence of lymph node metastasis. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 30(2), 73–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168850
- Laginha, K. M., Verwoert, S., Charrois, G. J. R., & Allen, T. M. (2005). Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clinical Cancer Research*, 11(19), 6944–6949. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0343
- Lambeng, N., Wallez, Y., Rampon, C., Cand, F., Christé, G., Gulino-Debrac, D., ... Huber, P. (2005). Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circulation Research*, 96(3), 384–391. doi:10.1161/01.RES.0000156652.99586.9f
- Lampugnani, M. G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B., & Dejana, E. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *The Journal of Cell Biology*, 129(1), 203–217. doi:10.1083/jcb.129.1.203

- Lan, R. F., Liu, Z. X., Liu, X. C., Song, Y. E., & Wang, D. W. (2005). CD151 promotes neovascularization and improves blood perfusion in a rat hind-limb ischemia model. *Journal of Endovascular Therapy: An Official Journal of the International Society of Endovascular Specialists*, 12, 469–478. doi:10.1583/04-1478R.1
- Lash, C. J., Li, A. E., Rutland, M., Baguley, B. C., Zwi, L. J., & Wilson, W. R. (1998). Enhancement of the anti-tumour effects of the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) by combination with 5-hydroxytryptamine and bioreductive drugs. *British Journal of Cancer*, 78(4), 439–45. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2063102&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C.-H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A., & Weinstein, B. M. (2001). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development (Cambridge, England)*, 128(19), 3675–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585794>
- Lawson, N. D., Vogel, A. M., & Weinstein, B. M. (2002). Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Developmental Cell*, 3, 127–136. doi:10.1016/S1534-5807(02)00198-3
- Le Naour, F., André, M., Greco, C., Billard, M., Sordat, B., Emile, J.-F., ... Rubinstein, E. (2006). Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 5(5), 845–57. doi:10.1074/mcp.M500330-MCP200
- Leccia, F., Nardone, A., Corvigno, S., Vecchio, L. Del, De Placido, S., Salvatore, F., & Veneziani, B. M. (2012). Cytometric and biochemical characterization of human breast cancer cells reveals heterogeneous myoepithelial phenotypes. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 81(11), 960–72. doi:10.1002/cyto.a.22095
- Lee, C. G., Heijn, M., di Tomaso, E., Griffon-Etienne, G., Ancukiewicz, M., Koike, C., ... Boucher, Y. (2000). Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Research*, 60(19), 5565–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034104>
- Lee, J., Ryu, Y., Ji, Y., Kang, J. H., & Moon, E. (2015). Hypoxia / reoxygenation-experienced cancer cell migration and metastasis are regulated by Rap1- and Rac1-GTPase activation via the expression of thymosin beta-4. *Oncotarget*, 6(12), 9820–9833.
- Lee, S., Chen, T. T., Barber, C. L., Jordan, M. C., Murdock, J., Desai, S., ... Iruela-Arispe, M. L. (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*, 130(4), 691–703. doi:10.1016/j.cell.2007.06.054
- Lee, S., Jilan, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D., & Luisa Iruela-Arispe, M. (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *Journal of Cell Biology*, 169, 681–691. doi:10.1083/jcb.200409115
- Leite de Oliveira, R., Deschoemaeker, S., Henze, A.-T., Debackere, K., Finisguerra, V., Takeda, Y., ... Mazzone, M. (2012). Gene-targeting of Phd2 improves tumor response to chemotherapy and prevents side-toxicity. *Cancer Cell*, 22(2), 263–77. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.028
- Leone, D. P., Genoud, S., Atanasoski, S., Grausenburger, R., Berger, P., Metzger, D., ... Suter, U. (2003). Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 22(4), 430–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727441>
- Leong, K. G., Niessen, K., Kulic, I., Raouf, A., Eaves, C., Pollet, I., & Karsan, A. (2007). Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(12), 2935–48. doi:10.1084/jem.20071082
- Leslie, J. D., Ariza-McNaughton, L., Bermange, A. L., McAdow, R., Johnson, S. L., & Lewis, J. (2007). Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis.

- Development (Cambridge, England)*, 134(5), 839–44. doi:10.1242/dev.003244
- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature Reviews. Genetics*, 2(10), 743–55. doi:10.1038/35093537
- Lewis, F. C., Bryan, N., & Hunt, J. a. (2012). A feeder-free, human plasma-derived hydrogel for maintenance of a human embryonic stem cell phenotype in vitro. *Cell Regeneration*, 1(1), 6. doi:10.1186/2045-9769-1-6
- Li, J., Jubb, A. M., & Harris, A. L. (2010). Targeting Dll4 in tumors shows preclinical activity but potentially significant toxicity. *Fututre Oncology*, 6(7), 1099–1103.
- Li, J. L., Sainson, R. C. a, Oon, C. E., Turley, H., Leek, R., Sheldon, H., ... Harris, A. L. (2011). DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. *Cancer Research*, 71(18), 6073–6083. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1704
- Li, J. L., Sainson, R. C. A., Shi, W., Leek, R., Harrington, L. S., Preusser, M., ... Harris, A. L. (2007). Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Research*, 67(23), 11244–11253. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0969
- Li, J.-L., & Harris, A. L. (2005). Notch signaling from tumor cells: a new mechanism of angiogenesis. *Cancer Cell*, 8(1), 1–3. doi:10.1016/j.ccr.2005.06.013
- Li, J.-L., & Harris, A. L. (2009). Crosstalk of VEGF and Notch pathways in tumour angiogenesis: therapeutic implications. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 3094–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273260>
- Li, L., Rojiani, A. M., & Siemann, D. W. (2002). Preclinical evaluations of therapies combining the vascular targeting agent combretastatin A-4 disodium phosphate and conventional anticancer therapies in the treatment of Kaposi's sarcoma. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 41(1), 91–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990525>
- Li, Q., Yang, X. H., Xu, F., Sharma, C., Wang, H.-X., Knoblich, K., ... Hemler, M. E. (2013). Tetraspanin CD151 plays a key role in skin squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 32(14), 1772–83. doi:10.1038/onc.2012.205
- Lifsted, T., Le Voyer, T., Williams, M., Muller, W., Klein-Szanto, A., Buetow, K. H., & Hunter, K. W. (1998). Identification of inbred mouse strains harboring genetic modifiers of mammary tumor age of onset and metastatic progression. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 77(4), 640–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679770>
- Lingaas, F., Comstock, K. E., Kirkness, E. F., Sørensen, A., Aarskaug, T., Hitte, C., ... Ostrander, E. A. (2003). A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. *Human Molecular Genetics*, 12(23), 3043–53. doi:10.1093/hmg/ddg336
- Liu, J. J., Ching, L.-M., Goldthorpe, M., Sutherland, R., Baguley, B. C., Kirker, J. A., & McKeage, M. J. (2007). Antitumour action of 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid in rats bearing chemically induced primary mammary tumours. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 59(5), 661–9. doi:10.1007/s00280-006-0321-7
- Liu, W. F., Zuo, H. J., Chai, B. L., Peng, D., Fei, Y. J., Lin, J. Y., ... Liu, Z. X. (2011). Role of tetraspanin CD151- α 3/ α 6 integrin complex: Implication in angiogenesis: CD151-integrin complex in angiogenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(4), 642–650. doi:10.1016/j.biocel.2011.01.004
- Liu, W. M., & Zhang, X. A. (2006). KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Letters*, 240(2), 183–94. doi:10.1016/j.canlet.2005.08.018
- Liu, Y.-R., Guan, Y.-Y., Luan, X., Lu, Q., Wang, C., Liu, H.-J., ... Fang, C. (2015). Delta-like ligand 4-targeted nanomedicine for antiangiogenic cancer therapy. *Biomaterials*, 42, 161–71. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.11.039
- Liu, Z., Fan, F., Wang, A., Zheng, S., & Lu, Y. (2014). Dll4-Notch signaling in regulation of tumor angiogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140(4), 525–536. doi:10.1007/s00432-013-1534-x

- Liu, Z., Turkoz, A., Jackson, E. N., Corbo, J. C., Engelbach, J. a., Garbow, J. R., ... Kopan, R. (2011). Notch1 loss of heterozygosity causes vascular tumors and lethal hemorrhage in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 800–808. doi:10.1172/JCI43114
- Liu, Z.-J., Xiao, M., Balint, K., Smalley, K. S. M., Brafford, P., Qiu, R., ... Herlyn, M. (2006). Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Research*, 66(8), 4182–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3589
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., ... Bruix, J. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–90. doi:10.1056/NEJMoa0708857
- Lobe, C. G., Koop, K. E., Kreppner, W., Lomeli, H., Gertsenstein, M., & Nagy, a. (1999). Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Developmental Biology*, 208(2), 281–292. doi:10.1006/dbio.1999.9209
- Lobov, I. B., Renard, R. A., Papadopoulos, N., Gale, N. W., Thurston, G., Yancopoulos, G. D., & Wiegand, S. J. (2007). Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3219–24. doi:10.1073/pnas.0611206104
- Loges, S., Mazzone, M., Hohensinner, P., & Carmeliet, P. (2009). Silencing or Fueling Metastasis with VEGF Inhibitors: Antiangiogenesis Revisited. *Cancer Cell*, 15(3), 167–170. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.007
- Lohela, M., Bry, M., Tammela, T., & Alitalo, K. (2009). VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 154–65. doi:10.1016/j.ceb.2008.12.012
- Loi, M., di Paolo, D., Becherini, P., Zorzoli, A., Perri, P., Carosio, R., ... Pastorino, F. (2011). The use of the orthotopic model to validate antivascular therapies for cancer. *International Journal of Developmental Biology*, 55(4-5), 547–555. doi:10.1387/ijdb.103230ml
- Longo, N., Yáñez-Mó, M., Mittelbrunn, M., De La Rosa, G., Muñoz, M. L., Sánchez-Madrid, F., & Sánchez-Mateos, P. (2001). Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood*, 98(13), 3717–3726. doi:10.1182/blood.V98.13.3717
- Lu, K. V., Chang, J. P., Parachoniak, C. A., Pandika, M. M., Aghi, M. K., Meyronet, D., ... Bergers, G. (2012). VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell*, 22(1), 21–35. doi:10.1016/j.ccr.2012.05.037
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., & Groom, A. C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American Journal of Pathology*, 153(3), 865–73. doi:10.1016/S0002-9440(10)65628-3
- Maccubbin, D. L., Wing, K. R., Mace, K. F., Ho, R. L. X., Ehrke, M. J., & Mihich, E. (1992). Adriamycin-induced Modulation of Host Defenses in Tumor-bearing Mice. *Cancer Research*, 52, 3572–3576.
- Maddison, L. a, Huss, W. J., Barrios, R. M., & Greenberg, N. M. (2004). Differential expression of cell cycle regulatory molecules and evidence for a “cyclin switch” during progression of prostate cancer. *The Prostate*, 58(4), 335–44. doi:10.1002/pros.10341
- Maecker, T., Todd, S. C., & Levy, S. (1997). The tetraspanin facilitators. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11, 428–442.
- Maes, H., Kuchnio, A., Peric, A., Moens, S., Nys, K., De Bock, K., ... Carmeliet, P. (2014). Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell*, 26(2), 190–206. doi:10.1016/j.ccr.2014.06.025
- Mailhos, C., Modlich, U., Lewis, J., Harris, a, Bicknell, R., & Ish-Horowicz, D. (2001). Delta4,

- an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 69(2-3), 135–44. doi:10.1046/j.1432-0436.2001.690207.x
- Maione, F., Capano, S., Regano, D., Zentilin, L., Giacca, M., Casanovas, O., ... Giraudo, E. (2012). Semaphorin 3A overcomes cancer hypoxia and metastatic dissemination induced by antiangiogenic treatment in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(5), 1832–48. doi:10.1172/JCI58976
- Maitland, M. L., Kasza, K. E., Karrison, T., Moshier, K., Sit, L., Black, H. R., ... Ratain, M. J. (2009). Ambulatory monitoring detects sorafenib-induced blood pressure elevations on the first day of treatment. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(19), 6250–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0058
- Malanchi, I., Santamaria-Martínez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.-A., Delaloye, J.-F., & Huelsken, J. (2012). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*, 481(7379), 85–9. doi:10.1038/nature10694
- Malik, F. A., Sanders, A. J., & Jiang, W. G. (2009). KAI-1/CD82, the molecule and clinical implication in cancer and cancer metastasis. *Histology and Histopathology*, 24(4), 519–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19224455>
- Mancuso, M. R., Davis, R., Norberg, S. M., O'Brien, S., Sennino, B., Nakahara, T., ... McDonald, D. M. (2006). Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *Journal of Clinical Investigation*, 116(10), 2610–2621. doi:10.1172/JCI24612
- Maniotis, a J., Folberg, R., Hess, a, Seftor, E. a, Gardner, L. M., Pe'er, J., ... Hendrix, M. J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American Journal of Pathology*, 155(3), 739–752. doi:10.1016/S0002-9440(10)65173-5
- Mansour, S. L., Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 336(6197), 348–352. doi:10.1038/336348a0
- Mantegazza, A. R., Barrio, M. M., Moutel, S., Bover, L., Weck, M., Brossart, P., ... Mordoh, J. (2004). CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells. *Blood*, 104(4), 1183–1190. doi:10.1182/blood-2004-01-0104
- Marcellini, M., De Luca, N., Riccioni, T., Ciucci, A., Orecchia, A., Lacal, P. M., ... Failla, C. M. (2006). Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor. *The American Journal of Pathology*, 169(2), 643–54. doi:10.2353/ajpath.2006.051041
- Marcelo, K. K. L., Goldie, L. C. L., & Hirschi, K. K. K. (2013). Regulation of Endothelial Cell Differentiation and Specification. *Circulation Research*, 112(9), 1272–1287. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300506.Regulation
- Marcocal, J., Moreno, A., Graells, J., Vidal, A., Escribà, J. M., Garcia-Ramirez, M., & Fabra, A. (1997). Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. *Journal of Cutaneous Pathology*, 24(4), 212–218. doi:10.1111/j.1600-0560.1997.tb01583.x
- Martin, D. B., Gifford, D. R., Wright, M. E., Martin, D. B., Gifford, D. R., Wright, M. E., ... Nelson, P. S. (2004). Quantitative Proteomic Analysis of Proteins Released by Neoplastic Prostate Epithelium Quantitative Proteomic Analysis of Proteins Released by Neoplastic Prostate Epithelium, 347–355.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7634–7638.
- Martinez, J. C., Müller, M. M., Turley, H., Steers, G., Choteau, L., Li, J.-L., ... Gatter, K. C. (2009). Nuclear and membrane expression of the angiogenesis regulator delta-like ligand 4 (DLL4) in normal and malignant human tissues. *Histopathology*, 54(5), 598–606.

doi:10.1111/j.1365-2559.2009.03279.x

- Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumor cells. *Nature*, 529, 298–306. doi:10.1038/nature17038
- Massi, D., Puig, S., Franchi, A., Malvey, J., Vidal-Sicart, S., González-Cao, M., ... Santucci, M. (2006). Tumour lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case-control study. *Journal of Clinical Pathology*, 59(2), 166–73. doi:10.1136/jcp.2005.028431
- Masumori, N., Thomas, T. Z., Chaurand, P., Case, T., Paul, M., Kasper, S., ... Matusik, R. J. (2001). A Probasin-Large T Antigen Transgenic Mouse Line Develops Prostate Adenocarcinoma and Neuroendocrine Carcinoma with Metastatic Potential. *Cancer Research*, (61), 2239–2249.
- Mattioni, T., Louvion, J. F., & Picard, D. (1994). Regulation of protein activities by fusion to steroid binding domains. *Methods in Cell Biology*, 43 Pt A, 335–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7823870>
- Mayer, L. D., Dougherty, G., Harasym, T. O., & Bally, M. B. (1997). The role of tumor-associated macrophages in the delivery of liposomal doxorubicin to solid murine fibrosarcoma tumors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(3), 1406–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067330>
- Mazzone, M., Dettori, D., Leite de Oliveira, R., Loges, S., Schmidt, T., Jonckx, B., ... Carmeliet, P. (2009). Heterozygous Deficiency of PHD2 Restores Tumor Oxygenation and Inhibits Metastasis via Endothelial Normalization. *Cell*, 136, 839–851. doi:10.1016/j.cell.2009.01.020
- Mazzone, M., Selfors, L. M., Albeck, J., Overholtzer, M., Sale, S., Carroll, D. L., ... Brugge, J. S. (2010). Dose-dependent induction of distinct phenotypic responses to Notch pathway activation in mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 5012–7. doi:10.1073/pnas.1000896107
- McClatchey, A. I. (1999). Modeling metastasis in the mouse. *Oncogene*, 18(38), 5334–9. doi:10.1038/sj.onc.1203086
- Mcdermott, J. V., Zhao, Y., & Sauer, B. (2004). A simple polymerase chain reaction screen for homologous targeting in embryonic stem cells. *Analytical Biochemistry*, 332, 401–403. doi:10.1016/j.ab.2004.05.027
- Melillo, G. (2006). Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Molecular Cancer Research : MCR*, 4(9), 601–5. doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0235
- Mendelson, C. R., & Boggaram, V. (1990). Hormonal and developmental regulation of pulmonary surfactant synthesis in fetal lung. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 4(2), 351–378. doi:10.1016/S0950-351X(05)80055-2
- Mereau, A., Grey, L., Piquet-Pellorce, C., & Heath, J. K. (1993). Characterization of a binding protein for leukemia inhibitory factor localized in extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, 122(3), 713–719.
- Mestas, J., & Hughes, C. C. W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(5), 2731–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978070>
- Metz, S., Daldrup-Unk, H. E., Richter, T., R  th, C., Ebert, W., Settles, M., ... Piert, M. (2003). Detection and quantification of breast tumor necrosis with MR imaging: value of the necrosis-avid contrast agent Gadophrin-3. *Academic Radiology*, 10(5), 484–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12755535>
- Metzger, D., & Chambon, P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods*, 24, 71–80. doi:10.1006/meth.2001.1159
- Michaelis, M., Michaelis, U. R., Fleming, I., Suhan, T., Cinatl, J., Blaheta, R. A., ... Cinatl, J. (2004). Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Molecular Pharmacology*, 65(3), 520–7. doi:10.1124/mol.65.3.520
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., &

- Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *The EMBO Journal*, 15(6), 1292–1300.
- Mihic-Probst, D., Ikenberg, K., Tinguely, M., Schraml, P., Behnke, S., Seifert, B., ... Dummer, R. (2012). Tumor cell plasticity and angiogenesis in human melanomas. *PloS One*, 7(3), e33571. doi:10.1371/journal.pone.0033571
- Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., ... Ciaccio, P. J. (2004). Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 82(1), 341–58. doi:10.1093/toxsci/kfh254
- Miles, D., Harbeck, N., Escudier, B., Hurwitz, H., Saltz, L., Van Cutsem, E., ... Sirz??n, F. (2011). Disease course patterns after discontinuation of bevacizumab: Pooled analysis of randomized phase III trials. *Journal of Clinical Oncology*, 29(1), 83–88. doi:10.1200/JCO.2010.30.2794
- Miles, K. M., Seshadri, M., Ciamporcerio, E., Adelaiye, R., Gillard, B., Sotomayor, P., ... Pili, R. (2014). Dll4 blockade potentiates the anti-tumor Effects of VEGF inhibition in renal cell carcinoma patient-derived xenografts. *PLoS ONE*, 9(11). doi:10.1371/journal.pone.0112371
- Miller, F. R., Medina, D., & Heppner, G. H. (1981). Preferential growth of mammary tumors in intact mammary fatpads. *Cancer Research*, 41(10), 3863–3867.
- Minn, A. J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G. P., Giri, D. D., Doubrovin, M., ... Massagué, J. (2005). Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 44–55. doi:10.1172/JCI22320
- Miranti, C. K. (2009). Controlling cell surface dynamics and signaling: How CD82/KAI1 suppresses metastasis. *Cellular Signalling*, 21(2), 196–211. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.023
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., ... Mekada, E. (2000). Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization. *Science*, 287(January), 321–324.
- Miyake, M., Nakano, K., Ieki, Y., Adachi, M., Huang, C. L., Itoi, S., ... Taki, T. (1995). Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Research*, 55(18), 4127–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7664290>
- Miyake, M., Nakano, K., Itoi, S., Koh, T., & Taki, T. (1996). Advances in Brief Motility-related Protein-1 (MRP-1 / CD9) Reduction as a Factor of Poor Prognosis in Breast Cancer1. *Breast, I*.
- Miyazaki, T., Müller, U., & Campbell, K. S. (1997). Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *EMBO Journal*, 16(14), 4217–4225. doi:10.1093/emboj/16.14.4217
- Mizobe, T., Ogata, Y., Murakami, H., Akagi, Y., Ishibashi, N., Mori, S., ... Shirouzu, K. (2008). Efficacy of the combined use of bevacizumab and irinotecan as a postoperative adjuvant chemotherapy in colon carcinoma. *Oncology Reports*, 20, 517–523. doi:10.3892/or
- Monvoisin, A., Alva, J. a., Hofmann, J. J., Zovein, A. C., Lane, T. F., & Iruela-Arispe, M. L. (2006). VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: A model for inducible recombination in the endothelium. *Developmental Dynamics*, 235(12), 3413–3422. doi:10.1002/dvdy.20982
- Morani, A., Barros, R. P. a, Imamov, O., Hultenby, K., Arner, A., Warner, M., & Gustafsson, J.-A. (2006). Lung dysfunction causes systemic hypoxia in estrogen receptor beta knockout (ERbeta-/-) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), 7165–9. doi:10.1073/pnas.0602194103
- Morikawa, K., Walker, S. M., Jessup, J. M., & Fidler, I. J. (1988). In vivo selection of highly

- metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Research*, 48(7), 1943–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3349467>
- Morris, V. L., Percy, D. B., Lizardo, M. M., Chambers, A. F., & MacDonald, I. C. (2013). Dormancy and Metastasis of Melanoma Cells to Lymph Nodes, Lung and Liver. In M. A. Hayat (Ed.), *Tumor Dormancy and Cellular Quiescence and Senescence* (pp. 63–78). Springer.
- Morse III, H. C. (2007). Building a Better Mouse: One Hundred Years of Genetics and Biology. In J. G. Fox, M. T. Davisson, F. W. Quimby, S. W. Barthold, C. E. Newcomer, & A. L. Smith (Eds.), *The mouse in Biomedical Research, Volume I, History, Wild mice and Genetics* (2nd ed.). Academic Press - Elsevier.
- Motoike, T., Markham, D. W., Rossant, J., & Sato, T. N. (2003). Evidence for novel fate of Flk1+ progenitor: contribution to muscle lineage. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 35(3), 153–9. doi:10.1002/gene.10175
- Motz, G. T., & Coukos, G. (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity*, 39(1), 61–73. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.005
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O., ... Figlin, R. A. (2007). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 356(2), 115–24. doi:10.1056/NEJMoa065044
- Mueller, B. M., & Reisfeld, R. A. (1991). Potential of the scid mouse as a host for human tumors. *Cancer Metastasis Reviews*, 10(3), 193–200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1764764>
- Mukherji, D., Temraz, S., Wehbe, D., & Shamseddine, A. (2013). Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 87(2), 122–31. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.01.002
- Mullendore, M. E., Koorstra, J.-B., Li, Y.-M., Offerhaus, G. J., Fan, X., Henderson, C. M., ... Feldmann, G. (2009). Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(7), 2291–301. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2004
- Munoz, R., Man, S., Shaked, Y., Lee, C. R., Wong, J., Francia, G., & Kerbel, R. S. (2006). Highly efficacious nontoxic preclinical treatment for advanced metastatic breast cancer using combination oral UFT-cyclophosphamide metronomic chemotherapy. *Cancer Research*, 66(7), 3386–91. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4411
- Murakami, T., Maki, W., Cardones, A. R., Fang, H., Tun Kyi, A., Nestle, F. O., & Hwang, S. T. (2002). Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Research*, 62(24), 7328–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499276>
- Murta, D., Batista, M., Silva, E., Trindade, A., Henrique, D., Duarte, A., & Lopes-da-Costa, L. (2013). Dynamics of Notch Pathway Expression during Mouse Testis Post-Natal Development and along the Spermatogenic Cycle. *PLoS ONE*, 8(8), e72767. doi:10.1371/journal.pone.0072767
- Murta, D., Batista, M., Silva, E., Trindade, A., Mateus, L., Duarte, A., & Lopes-da-Costa, L. (2014). Differential expression of Notch component and effector genes during ovarian follicle and corpus luteum development during the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility, and Development*. doi:10.1071/RD13399
- Murta, D., Batista, M., Trindade, A., Silva, E., Henrique, D., Duarte, A., & Lopes-da-Costa, L. (2014). In vivo notch signaling blockade induces abnormal spermatogenesis in the mouse. *PloS One*, 9(11), e113365. doi:10.1371/journal.pone.0113365
- Murta, D., Batista, M., Trindade, A., Silva, E., Mateus, L., Duarte, A., & Lopes-da-Costa, L. (2015). Dynamics of Notch signalling in the mouse oviduct and uterus during the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility, and Development*. doi:10.1071/RD15029

- Nagamachi, Y., Tani, M., Shimizu, K., Tsuda, H., Niitsu, Y., & Yokota, J. (1998). Orthotopic growth and metastasis of human non-small cell lung carcinoma cell injected into the pleural cavity of nude mice. *Cancer Letters*, 127(1-2), 203–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9619878>
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26(2), 99–109. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686599>
- Nagy, A., & Rossant, J. (2000). Production and analysis of ES cell aggregation chimeras. In A. L. Joyner (Ed.), *Gene Targeting: a practical approach* (2nd ed., pp. 177–206). Oxford University Press.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., & Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(18), 8424–8. doi:10.1073/pnas.90.18.8424
- Nagy, J. A., Chang, S. H., Shih, S. C., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(3), 321–331. doi:10.1055/s-0030-1253454
- Naito, S., von Eschenbach, A. C., Giavazzi, R., & Fidler, I. J. (1986). Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *Cancer Res*, 46(8), 4109–4115. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3731078>
- Nangia-Makker, P., Hogan, V., Honjo, Y., Baccarini, S., Tait, L., Bresalier, R., & Raz, A. (2002). Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(24), 1854–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488479>
- Nanni, P., De Giovanni, C., Nicoletti, G., Del Re, B., Scotlandi, K., & Lollini, P. L. (1989). Human rhabdomyosarcoma cells in nude mice as a model for metastasis and differentiation. *Invasion & Metastasis*, 9(4), 231–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2737842>
- Nanus, D. M., Schmitz-Dräger, B. J., Motzer, R. J., Lee, A. C., Vlamis, V., Cordon-Cardo, C., ... Reuter, V. E. (1993). Expression of basic fibroblast growth factor in primary human renal tumors: correlation with poor survival. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(19), 1597–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8411233>
- Nassare, P., Gemmill, R. M., & Drabkin, H. A. (2014). The emerging role of class-3 semaphorins and their neuropilin receptors in oncology. *Oncotargets and Therapy*, 7, 1663–1687.
- Nathanson, S. D., Haas, G. P., Mead, M. J., & Lee, M. (1986, September). Spontaneous regional lymph node metastases of three variants of the B16 melanoma: relationship to primary tumor size and pulmonary metastases. *Journal of Surgical Oncology*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3762173>
- National Cancer Institute. (2016). Mouse Cancer Models. *eMice*. Retrieved February 11, 2016, from <http://emice.nci.nih.gov/aam/mouse>
- National Center for Biotechnology Information. (2004). Mitomycin C, CID=5746. *PubChem Compound Database*. Retrieved May 15, 2015, from http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/mitomycin_C#section=Top
- Naumov, G. N., Akslen, L. a., & Folkman, J. (2006). Role of angiogenesis in human tumor dormancy: Animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle*, 5(16), 1779–1787. doi:10.4161/cc.5.16.3018
- Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., ... Zöller, M. (2010). Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Research*, 70(4), 1668–78. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2470
- NCBI. (2015a). TSPAN18 tetraspanin 18 [Homo sapiens (human)]. *Gene*. Retrieved April 17,

- 2015, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/90139?report=full_report
- NCBI. (2015b). Tspan18 tetraspanin 18 [Mus musculus (house mouse)]. *Gene*. Retrieved April 17, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/241556>
- Neitzel, L. T., Neitzel, C. D., Magee, K. L., & Malafa, M. P. (1999). Angiogenesis correlates with metastasis in melanoma. *Annals of Surgical Oncology*, 6(1), 70–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10030417>
- Neulat-Duga, I., Sheppel, A., Marty, C., Lacroux, F., Pourrat, J., Caverivière, P., & Delsol, G. (1984). Metastases of human tumor xenografts in nude mice. *Invasion & Metastasis*, 4(4), 209–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6533093>
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1(7), 841–845. doi:10.1385/1-59259-409-3:55
- Neville, M. E., & Pezzella, M. (1994). Anti-tumor effects of interleukin 1beta: in vivo induction of immunity to B16 melanoma, a non-immunogenic tumour. *Cytokine*.
- Newling, D. W. W. (1992). The use of Adriamycin and its derivatives in the treatment of prostatic cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 30, S90–S94.
- Ngan, E. S. ., Schillinger, K., DeMayo, F., & Tsai, S. Y. (2002). The mifepristone-inducible gene regulatory system in mouse models of disease and gene therapy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13(2), 143–149. doi:10.1016/S1084-9521(02)00020-4
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., ... Lazebnik, Y. A. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376(6535), 37–43. doi:10.1038/376037a0
- Nicolson, G. L. (1993). Cancer progression and growth: relationship of paracrine and autocrine growth mechanisms to organ preference of metastasis. *Experimental Cell Research*, 204(2), 171–80. doi:10.1006/excr.1993.1022
- Nicolson, G. L. (1994). Tumor microenvironment: paracrine and autocrine growth mechanisms and metastasis to specific sites. *Frontiers of Radiation Therapy and Oncology*, 28, 11–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7982590>
- Nicolson, G. L., Nakajima, M., Herrmann, J. L., Menter, D. G., Cavanaugh, P. G., Park, J. S., & Marchetti, D. (1994). Malignant melanoma metastasis to brain: role of degradative enzymes and responses to paracrine growth factors. *Journal of Neuro-Oncology*, 18(2), 139–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7964976>
- Niwa, H., Yamamura, K., & Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108(2), 193–199. doi:10.1016/0378-1119(91)90434-D
- Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N. J., Coetsee, S., Boland, P., Gale, N. W., ... Thurston, G. (2006). Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*, 444, 1032–7. doi:10.1038/nature05355
- Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity*, 41(1), 49–61. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010
- Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J., & Aifantis, I. (2014). From fly wings to targeted cancer therapies: A centennial for notch signaling. *Cancer Cell*, 25(3), 318–334. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.018
- O’Gorman, S., Fox, D. T., & Wahl, G. M. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science*, 251(4999), 1351–1355. doi:10.1126/science.1900642
- O’Reilly, M., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., ... Folkman, J. (1994). Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell*, 79(2), 315–328. doi:10.1016/0092-8674(94)90200-3
- O’Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., ... Folkman, J. (1997). Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth result

- of a net balance between these positive and negative regulators of neovascularization (Rastinejad et al. *Cell*, 88, 277–285.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Chen, C., & Folkman, J. (1996). Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Medicine*, 2(6), 689–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640562>
- O-charoenrat, P., Modjtahedi, H., Rhys-evans, P., Court, W. J., Box, G. M., & Eccles, S. A. (2000). Epidermal Growth Factor-like Ligands Differentially Up-Regulate Matrix Metalloproteinase 9 in Head and Neck Squamous Carcinoma Cells. *Cancer Res.*, 60(4), 1121–1128. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/4/1121.full.html>
- Odintsova, E., Sugiura, T., & Berditchevski, F. (2000). Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Current Biology : CB*, 10(16), 1009–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10985391>
- Okamura, H., Lorusso, J., Bell, A., Perino, S., Keane, D., Brodeur, J., ... O'Hagan, R. C. (2010). Abstract 5170: Monoclonal antibodies to Notch receptors inhibit tumor maintenance. *Cancer Research*, 70(8 Supplement), 5170–5170. doi:10.1158/1538-7445.AM10-5170
- Olson, E. N., Arnold, H. H., Rigby, P. W., & Wold, B. J. (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell*, 85(1), 1–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620528>
- Orban, P. C., Chui, D., & Marth, J. D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 6861–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=49604&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ornitz, D. M., Moreadith, R. W., & Leder, P. (1991). Binary system for regulating transgene expression in mice: targeting int-2 gene expression with yeast GAL4/UAS control elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(3), 698–702. doi:10.1073/pnas.88.3.698
- Otomo, R., Otsubo, C., Matsushima-Hibiya, Y., Miyazaki, M., Tashiro, F., Ichikawa, H., ... Enari, M. (2014). TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2–7. doi:10.1073/pnas.1412062112
- Otsubo, C., Otomo, R., Miyazaki, M., Matsushima-Hibiya, Y., Kohno, T., Iwakawa, R., ... Enari, M. (2014). TSPAN2 is involved in cell invasion and motility during lung cancer progression. *Cell Reports*, 7(2), 527–38. doi:10.1016/j.celrep.2014.03.027
- Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Viñals, F., ... Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*, 15(3), 220–31. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.027
- Paigen, K. (2002). Understanding the Human Condition: Experimental Strategies in Mammalian Genetics Genetic Research Strategies Using the Phenotype-driven Approaches. *ILAR Journal*, 43(3).
- Palazón, A., Aragonés, J., Morales-Kastresana, A., de Landázuri, M. O., & Melero, I. (2012). Molecular pathways: hypoxia response in immune cells fighting or promoting cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(5), 1207–13. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1591
- Palomero, T., & Ferrando, A. (2009). Therapeutic targeting of NOTCH1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, 9 Suppl 3, S205–10. doi:10.3816/CLM.2009.s.013
- Papayioannou, V., & Johnson, R. (2000). Production of chimeras by blastocyst and morula injection of targeted ES cells. In A. L. Joyner (Ed.), *Gene Targeting: a practical approach* (2nd ed., pp. 133–175). Oxford University Press.
- Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A., & Ferrara, N. (1994). Placenta growth factor:

- Potential of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25646–25654. doi:10.1371/journal.pone.0018076
- Patel, N. S., Dobbie, M. S., Rochester, M., Steers, G., Poulson, R., Le Monnier, K., ... Harris, A. L. (2006). Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(16), 4836–44. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0285
- Patel, N. S., Li, J.-L., Generali, D., Poulson, R., Cranston, D. W., & Harris, A. L. (2005). Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer Research*, 65(19), 8690–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1208
- Peddibhotla, S. S. D., Brinkmann, B. F., Kummer, D., Tuncay, H., Nakayama, M., Adams, R. H., ... Ebnet, K. (2013). Tetraspanin CD9 links JAM-A to $\alpha\beta 3$ integrin to mediate bFGF-specific angiogenic signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 1–33. doi:10.1091/mbc.E12-06-0481
- Pedrosa, A., Trindade, A., Carvalho, C., Graça, J., Peleteiro, M. C., Adams, R. H., & Duarte, A. (2015). Endothelial Jagged1 promotes solid tumor growth through both pro-angiogenic and angiocrine functions. *Oncotarget*. Retrieved from <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B0%5D=4380&path%5B1%5D=9962>
- Pedrosa, A.-R., Graça, J. L., Carvalho, S., Peleteiro, M. C., Duarte, A., & Trindade, A. (2016). Notch signaling dynamics in the adult healthy prostate and in prostatic tumor development. *The Prostate*, 76(1), 80–96. doi:10.1002/pros.23102
- Penna, D., Schmidt, A., & Beermann, F. (1998). Tumors of the retinal pigment epithelium metastasize to inguinal lymph nodes and spleen in tyrosinase-related protein 1/SV40 T antigen transgenic mice. *Oncogene*, 17(20), 2601–7. doi:10.1038/sj.onc.1202196
- Pennisi, E. (2002). Canine evolution. A shaggy dog history. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5598), 1540–2. doi:10.1126/science.298.5598.1540
- Perez-Hernandez, D., Gutierrez-Vazquez, C., Jorge, I., Lopez-Martin, S., Ursa, A., Sanchez-Madrid, F., ... Yanez-Mo, M. (2013). The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries to exosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1–19. doi:10.1074/jbc.M112.445304
- Perez-stable, C., Altman, N. H., Mehta, P. P., Deftos, L. J., & Roos, B. A. (1997). Prostate Cancer progression, Metastasis and Gene expression. *Cancer Research*, 57, 900–907.
- Petit, A. M., Rak, J., Hung, M. C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B., & Kerbel, R. S. (1997). Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of so. *The American Journal of Pathology*, 151(6), 1523–30. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1858348&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pettersson, A., Nagy, J. A., Brown, L. F., Sundberg, C., Morgan, E., Jungles, S., ... Dvorak, H. F. (2000). Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 80(1), 99–115. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653008>
- Phillips, R. A., Jewett, M. A., & Gallie, B. L. (1989). Growth of human tumors in immune-deficient scid mice and nude mice. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 152, 259–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2805794>
- Phng, L. K., & Gerhardt, H. (2009). Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch. *Developmental Cell*, 16(2), 196–208. doi:10.1016/j.devcel.2009.01.015

- Phng, L. K., Potente, M., Leslie, J. D., Babbage, J., Nyqvist, D., Lobov, I., ... Gerhardt, H. (2009). Nrarp Coordinates Endothelial Notch and Wnt Signaling to Control Vessel Density in Angiogenesis. *Developmental Cell*, 16(1), 70–82. doi:10.1016/j.devcel.2008.12.009
- Pomper, M. G. (2002). Can small animal imaging accelerate drug development? *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, 39, 211–20. doi:10.1002/jcb.10443
- Pontén, F., Jirstrom, K., & Uhlen, M. (2008). The Human Protein Atlas--a tool for pathology. *The Journal of Pathology*, 216(4), 387–93. doi:10.1002/path.2440
- Poste, G. (1982). Experimental systems for analysis of the malignant phenotype. *Cancer Metastasis Reviews*, 1(2), 141–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6764376>
- Poste, G., Doll, J., Hart, I. R., & Fidler, I. J. (1980). In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Research*, 40(5), 1636–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7370995>
- Potente, M., Gerhardt, H., & Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146(6), 873–887. doi:10.1016/j.cell.2011.08.039
- Pötgens, A. J. G., Lubsen, N. H., Vanaltena, M. C., Schoenmakers, J. G. G., Ruiter, D. J., & Dewaal, R. M. W. (1995). Vascular permeability factor expression influences tumor angiogenesis in human melanoma lines xenografted to nude mice. *Am.J.Pathol.*, 146(1), 197–209.
- Potter, H., Weir, L., & Leder, P. (1984). Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(22), 7161–7165. doi:10.1073/pnas.81.22.7161
- Prandini, M.-H., Dreher, I., Bouillot, S., Benkerri, S., Moll, T., & Huber, P. (2005). The human VE-cadherin promoter is subjected to organ-specific regulation and is activated in tumour angiogenesis. *Oncogene*, 24(18), 2992–3001. doi:10.1038/sj.onc.1208483
- Pratt, T., Sharp, L., Nichols, J., Price, D. J., & Mason, J. O. (2000). Embryonic stem cells and transgenic mice ubiquitously expressing a tau-tagged green fluorescent protein. *Developmental Biology*, 228(1), 19–28. doi:10.1006/dbio.2000.9935
- Price, J. E., & Zhang, R. D. (1990). Studies of human breast cancer metastasis using nude mice. *CANCER AND METASTASIS REVIEW*, 8(4), 285–297. doi:10.1007/BF00052605
- Proctor, J. W., Yamamura, Y., Gaydos, D., & Mastromatteo, W. (1981). Further Studies on Endocrine Factors and the Growth and Spread of B₁₆ Melanoma. *Oncology*, 38(2), 102–105. doi:10.1159/000225531
- Protzel, C., Kakies, C., Kleist, B., Poetsch, M., & Giebel, J. (2008). Down-regulation of the metastasis suppressor protein KAI1/CD82 correlates with occurrence of metastasis, prognosis and presence of HPV DNA in human penile squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv*, 452(4), 369–375. doi:10.1007/s00428-008-0590-0
- Qian, D. Z., Wang, X., Kachhap, S. K., Kato, Y., Wei, Y., Zhang, L., ... Pili, R. (2004). The histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 inhibits angiogenesis and has a greater antitumor effect in combination with the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Research*, 64(18), 6626–34. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0540
- Qiao, L., & Wong, B. C. Y. (2009). Role of notch signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 30(12), 1979–1986. doi:10.1093/carcin/bgp236
- Qu, B., Guo, L., Ma, J., & Lv, Y. (2010). Antiangiogenesis therapy might have the unintended effect of promoting tumor metastasis by increasing an alternative circulatory system. *Medical Hypotheses*, 74(2), 360–361. doi:10.1016/j.mehy.2009.08.020
- Quaife, C. J., Pinkert, C. A., Ornitz, D. M., Palmiter, R. D., & Brinster, R. L. (1987). Pancreatic neoplasia induced by ras expression in acinar cells of transgenic mice. *Cell*, 48(6), 1023–1034. doi:10.1016/0092-8674(87)90710-0

- Quigley, J. P., & Armstrong, P. B. (1998). Tumor cell intravasation Alu-cidated: The chick embryo opens the window. *Cell*, 94(3), 281–284. doi:10.1016/S0092-8674(00)81470-1
- Radford, K. J., Thorne, R. F., & Hersey, P. (1997). Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(7), 3353–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9120293>
- Radinsky, R. (1995). Molecular mechanisms for organ-specific colon carcinoma metastasis. *European Journal of Cancer*, 31A(7-8), 1091–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576998>
- Rajasekhar, V. K., Studer, L., Gerald, W., Socci, N. D., & Scher, H. I. (2011). Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF- κ B signalling. *Nature Communications*, 2(1), 162. doi:10.1038/ncomms1159
- Rak, J., Mitsushashi, Y., Erdos, V., Huang, S. N., Filmus, J., & Kerbel, R. S. (1995). Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression. *The Journal of Cell Biology*, 131(6 Pt 1), 1587–98. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2120690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ramanujan, S., Koenig, G. C., Padera, T. P., Stoll, B. R., & Jain, R. K. (2000). Local imbalance of proangiogenic and antiangiogenic factors: A potential mechanism of focal necrosis and dormancy in tumors. *Cancer Research*, 60(5), 1442–1448.
- Ranieri, G., Patruno, R., Ruggieri, E., Montemurro, S., Valerio, P., & Ribatti, D. (2006). Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. *Current Medicinal Chemistry*, 13(16), 1845–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842197>
- Razandi, M., Pedram, A., Park, S. T., & Levin, E. R. (2003). Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2701–2712. doi:10.1074/jbc.M205692200
- Real, P. J., & Ferrando, A. A. (2009). NOTCH inhibition and glucocorticoid therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 23(8), 1374–7. doi:10.1038/leu.2009.75
- Rebhun, R. B., Cheng, H., Gershenwald, J. E., Fan, D., Fidler, I. J., & Langley, R. R. (2010). Constitutive Expression of the α 4 Integrin Correlates with Tumorigenicity and Lymph Node Metastasis of the B16 Murine Melanoma. *Neoplasia*, 12(2), 173–182. doi:10.1593/neo.91604
- Reedijk, M., Odorcic, S., Chang, L., Zhang, H., Miller, N., McCready, D. R., ... Sean, E. (2005). High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Research*, 65(18), 8530–8537. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1069
- Relf, M., LeJeune, S., Scott, P. A., Fox, S., Smith, K., Leek, R., ... Harris, A. L. (1997). Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary. *Cancer Research*, 57(5), 963–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041202>
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, a, & Bongso, a. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology*, 18(4), 399–404. doi:10.1038/74447
- Reynolds, J. (1954). The epidermal melanocytes of mice. *Journal of Anatomy*, 88, 45–58.2.
- Richardson, M. M., Jennings, L. K., & Zhang, X. a. (2011). Tetraspanins and tumor progression. *Clinical & Experimental Metastasis*, 28(3), 261–70. doi:10.1007/s10585-010-9365-5
- Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W.-C., Chantry, Y., ... Yan, M. (2006). Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*,

- 444(7122), 1083–7. doi:10.1038/nature05313
- Riele, H. Te, Manndag, E. R., & Berns, A. (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(June), 5128–5132.
- Risau, W., & Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11, 73–91.
- Risinger, J. I., Custer, M., Feigenbaum, L., Simpson, R. M., Hoover, S. B., Webster, J. D., ... Barrett, J. C. (2014). Normal viability of Kai1/Cd82 deficient mice. *Molecular Carcinogenesis*, 53(8), 610–24. doi:10.1002/mc.22009
- Rizzo, P., Miao, H., D'Souza, G., Osipo, C., Song, L. L., Yun, J., ... Miele, L. (2008). Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Research*, 68(13), 5226–35. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5744
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., & Evans, M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*, 323(6087), 445–8. doi:10.1038/323445a0
- Rofstad, E. K., Galappathi, K., & Mathiesen, B. (2004). Thrombospondin-1 treatment prevents growth of dormant lung micrometastases after surgical resection and curative radiation therapy of the primary tumor in human melanoma xenografts. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 58(2), 493–499. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.09.030
- Rofstad, E. K., & Graff, B. A. (2001). Thrombospondin-1-mediated metastasis suppression by the primary tumor in human melanoma xenografts. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(5), 1042–1049. doi:10.1046/j.0022-202X.2001.01552.x
- Rogosin, S., & Sandler, A. B. (2012). Beyond bevacizumab: Antiangiogenic agents. *Clinical Lung Cancer*, 13(5), 326–333. doi:10.1016/j.clcc.2011.12.001
- Rolny, C., Mazzone, M., Tugues, S., Laoui, D., Johansson, I., Coulon, C., ... Carmeliet, P. (2011). HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell*, 19(1), 31–44. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.009
- Roma, J., Masià, A., Reventós, J., Sánchez de Toledo, J., & Gallego, S. (2011). Notch pathway inhibition significantly reduces rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(3), 505–13. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0166
- Roselli, S., Kahl, R. G., Copeland, B. T., Naylor, M. J., Weidenhofer, J., Muller, W. J., & Ashman, L. K. (2014). Deletion of Cd151 reduces mammary tumorigenesis in the MMTV/PyMT mouse model. *BMC Cancer*, 14, 509. doi:10.1186/1471-2407-14-509
- Roy, H., Bhardwaj, S., Babu, M., Jauhainen, S., Herzig, K.-H., Bellu, A. R., ... Ylä-Herttuala, S. (2005). Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. *Human Gene Therapy*, 16(12), 1422–8. doi:10.1089/hum.2005.16.1422
- Rozenberg, G. I., Monahan, K. B., Torrice, C., Bear, J. E., & Sharpless, N. E. (2010). Metastasis in an Orthotopic Murine Model of Melanoma is Independent of RAS/RAF Mutation. *Melanoma Research*, 20(5), 361–371. doi:10.1097/CMR.0b013e328336ee17.Metastasis
- Rustin, G. J. S., Nathan, P. D., Boxall, J., Saunders, L., Ganesan, T. S., & Shreeves, G. E. (2005). A phase Ib trial of combretastatin A- 4 phosphate (CA4P) in combination with carboplatin or paclitaxel chemotherapy in patients with advanced cancer. *ASCO Meeting Abstracts*, 23(16_suppl), 3103. Retrieved from http://hwmaint.meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/23/16_suppl/3103
- Rygaard, J., & Poulsen, C. O. (2009). Heterotransplantation of a human malignant tumour to “nude” mice. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 77(4), 758–760. doi:10.1111/j.1699-0463.1969.tb04520.x
- Sachs, N., Secades, P., van Hulst, L., Song, J.-Y., & Sonnenberg, A. (2014). Reduced susceptibility to two-stage skin carcinogenesis in mice with epidermis-specific deletion of

- CD151. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(1), 221–8. doi:10.1038/jid.2013.280
- Sadej, R., Romanska, H., Baldwin, G., Gkirtzimanaki, K., Novitskaya, V., Filer, A. D., ... Berditchevski, F. (2009). CD151 regulates tumorigenesis by modulating the communication between tumor cells and endothelium. *Molecular Cancer Research: MCR*, 7(6), 787–98. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0574
- Sadej, R., Romanska, H., Kavanagh, D., Baldwin, G., Takahashi, T., Kalia, N., & Berditchevski, F. (2010). Tetraspanin CD151 regulates transforming growth factor beta signaling: implication in tumor metastasis. *Cancer Research*, 70(14), 6059–70. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3497
- Saharinen, P., Eklund, L., Pulkki, K., Bono, P., & Alitalo, K. (2011). VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends in Molecular Medicine*, 17(7), 347–362. doi:10.1016/j.molmed.2011.01.015
- Sainson, R. C. A., Aoto, J., Nakatsu, M. N., Holderfield, M., Conn, E., Koller, E., & Hughes, C. C. W. (2005). Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19, 1027–1029. doi:10.1096/fj.04-3172fje
- Sainson, R. C. A., & Harris, A. L. (2006). Hypoxia-regulated differentiation: let's step it up a Notch. *Trends in Molecular Medicine*, 12(4), 141–3. doi:10.1016/j.molmed.2006.02.001
- Sainson, R. C. A., & Harris, A. L. (2007). Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis? *Trends in Molecular Medicine*, 13(9), 389–95. doi:10.1016/j.molmed.2007.07.002
- Sainson, R. C. A., & Harris, A. L. (2008). Regulation of angiogenesis by homotypic and heterotypic notch signalling in endothelial cells and pericytes: from basic research to potential therapies. *Angiogenesis*, 11(1), 41–51. doi:10.1007/s10456-008-9098-0
- Salinas-Jazmín, N., de la Fuente, M., Jaimez, R., Pérez-Tapia, M., Pérez-Torres, A., & Velasco-Velázquez, M. a. (2010). Antimetastatic, antineoplastic, and toxic effects of 4-hydroxycoumarin in a preclinical mouse melanoma model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 65(5), 931–40. doi:10.1007/s00280-009-1100-z
- Salmon, H. W., Guha, A., Rojiani, A. M., & Siemann, D. W. (2012). Vascular development in mouse lung metastases. *American Journal of Cancer Research*, 2(5), 581–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3433106&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001a). Protocol 23: The Hanahan Method for preparation and transformation of competent E.coli: high efficiency transformation. In J. F. Sambrook & D. M. Russel (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., pp. 1.110–1.111). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001b). Protocol 5: DNA transfection by electroporation. In J. Sambrook & D. W. Russell (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., pp. 16.33–16.36, 16.54). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001c). Purification of nucleic acids: extraction with phenol-chlorophorm. In J. Sambrook & D. W. Russell (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., pp. A8.9–A8.10). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandy, A. R., & Maillard, I. (2009). Notch signaling in the hematopoietic system. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(11), 1383–98. doi:10.1517/14712590903260777
- Santagata, S., Demichelis, F., Riva, a., Varambally, S., Hofer, M. D., Kutok, J. L., ... Aster, J. C. (2004). JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. *Cancer Research*, 64(19), 6854–6857. doi:64/19/6854 [pii]r10.1158/0008-5472.CAN-04-2500
- Sauer, B., & Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by

- the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(July), 5166–5170.
- Sauer, B., & Henderson, N. (1989). Cre-stimulated recombination at lox-P containing sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Research*, 17(1), 147–161.
- Sauer, G., Windisch, J., Kurzeder, C., Heilmann, V., Kreienberg, R., & Deissler, H. (2003). Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of CD9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(17), 6426–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695144>
- Scappaticci, F. A., Fehrenbacher, L., Cartwright, T., Hainsworth, J. D., Heim, W., Berlin, J., ... Hurwitz, H. (2005). Surgical wound healing complications in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Journal of Surgical Oncology*, 91(3), 173–80. doi:10.1002/jso.20301
- Scehnet, J. S., Jiang, W., Kumar, S. R., Krasnoperov, V., Benedito, R., Djokovic, D., ... Gill, P. S. (2007). Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood*, 109(11), 4753–4760. doi:10.1182/blood-2006-12-063933
- Scherberich, a, Moog, S., Haan-Archipoff, G., Azorsa, D. O., Lanza, F., & Beretz, a. (1998). Tetraspanin CD9 is associated with very late-acting integrins in human vascular smooth muscle cells and modulates collagen matrix reorganization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18, 1691–1697.
- Schietroma, C., Cianfarani, F., Lacal, P. M., Odorisio, T., Orecchia, A., Kanitakis, J., ... Zambruno, G. (2003). Vascular endothelial growth factor-C expression correlates with lymph node localization of human melanoma metastases. *Cancer*, 98(4), 789–97. doi:10.1002/cncr.11583
- Schmidt, T., Kharabi Masouleh, B., Loges, S., Cauwenberghs, S., Fraisl, P., Maes, C., ... Carmeliet, P. (2011). Loss or inhibition of stromal-derived PlGF prolongs survival of mice with imatinib-resistant Bcr-Abl1(+) leukemia. *Cancer Cell*, 19(6), 740–53. doi:10.1016/j.ccr.2011.05.007
- Schomber, T., Kopfstein, L., Djonov, V., Albrecht, I., Baeriswyl, V., Strittmatter, K., & Christofori, G. (2007). Placental growth factor-1 attenuates vascular endothelial growth factor-A-dependent tumor angiogenesis during beta cell carcinogenesis. *Cancer Research*, 67(22), 10840–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1034
- Schönig, K., Schwenk, F., Rajewsky, K., & Bujard, H. (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Research*, 30(23), e134. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=137989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schrijvers, B. F., Flyvbjerg, A., & De Vriese, A. S. (2004). The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney International*, 65(6), 2003–17. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00621.x
- Schröder, H. M., Hoffmann, S., Hecker, M., Korff, T., & Ludwig, T. (2013). The tetraspanin network modulates MT1-MMP cell surface trafficking. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, null(null). doi:10.1016/j.biocel.2013.02.020
- Schröder, J., Lüllmann-Rauch, R., Himmerkus, N., Pleines, I., Nieswandt, B., Orinska, Z., ... Saftig, P. (2009). Deficiency of the tetraspanin CD63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. *Molecular and Cellular Biology*, 29(4), 1083–1094. doi:10.1128/MCB.01163-08
- Schwartz, B., Birk, Y., Raz, A., & Madar, Z. (2004). Nutritional-pharmacological combinations: a novel approach to reducing colon cancer incidence. *European Journal of Nutrition*, 43(4), 221–229. doi:10.1007/s00394-004-0462-6
- Segarra, M., Williams, C. K., De, M., Sierra, L., Bernardo, M., Peter, J., ... McCormick, P. J.

- (2008). Dll4 activation of Notch signaling reduces tumor vascularity and inhibits tumor growth. *Blood*, 112(5), 1904–1911. doi:10.1182/blood-2007-11-126045
- Seguin, F., Carvalho, M. A., Bastos, D. C., Agostini, M., Zecchin, K. G., Alvarez-Flores, M. P., ... Graner, E. (2012). The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. *British Journal of Cancer*, 107(6), 977–87. doi:10.1038/bjc.2012.355
- Semenza, G. L. (2008). Does loss of CD151 expression promote the metastasis of hypoxic colon cancer cells? *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(24), 7969–70. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2417
- Semenza, G. L. (2014). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annual Review of Pathology*, 9, 47–71. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104720
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, a M., Perruzzi, C. a, Harvey, V. S., & Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4587), 983–985. doi:6823562
- Sengupta, K., Banerjee, S., Saxena, N. K., & Banerjee, S. K. (2004). Thombospondin-1 disrupts estrogen-induced endothelial cell proliferation and migration and its expression is suppressed by estradiol. *Molecular Cancer Research : MCR*, 2(3), 150–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037654>
- Sennino, B., Ishiguro-Oonuma, T., Wei, Y., Naylor, R. M., Williamson, C. W., Bhagwandin, V., ... McDonald, D. M. (2012). Suppression of tumor invasion and metastasis by concurrent inhibition of c-Met and VEGF signaling in pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Discovery*, 2(3), 270–87. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0240
- Sennino, B., & McDonald, D. M. (2012). Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 699–709. doi:10.1038/nrc3366
- Sethi, N., Dai, X., Winter, C. G., & Kang, Y. (2011). Tumor-Derived Jagged1 Promotes Osteolytic Bone Metastasis of Breast Cancer by Engaging Notch Signaling in Bone Cells. *Cancer Cell*, 19(2), 192–205. doi:10.1016/j.ccr.2010.12.022
- Sharkey, F. E., & Fogh, J. (1984). Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Reviews*, 3(4), 341–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6394126>
- Sharpless, N. E., & Depinho, R. A. (2006). The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(9), 741–754. doi:10.1038/nrd2110
- Shi, W., & Siemann, D. W. (2005). Targeting the tumor vasculature: enhancing antitumor efficacy through combination treatment with ZD6126 and ZD6474. *In Vivo (Athens, Greece)*, 19(6), 1045–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277020>
- Shi, Y., Parhar, R. S., Zou, M., Al-Mohanna, F. a, & Paterson, M. C. (2002). Gene therapy of melanoma pulmonary metastasis by intramuscular injection of plasmid DNA encoding tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Cancer Gene Therapy*, 9(2), 126–32. doi:10.1038/sj.cgt.7700426
- Shibuya, M. (2008). Vascular permeability/Vascular Endothelial Growth Factor. In W. D. Figg & J. Folkman (Eds.), *Angiogenesis - An Integrative Approach From Science to Medicine* (pp. 85–98). Springer.
- Shojaei, F., Simmons, B. H., Lee, J. H., Lappin, P. B., & Christensen, J. G. (2012). HGF/c-Met pathway is one of the mediators of sunitinib-induced tumor cell type-dependent metastasis. *Cancer Letters*, 320(1), 48–55. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.026
- Shojaei, F., Wu, X., Malik, A. K., Zhong, C., Baldwin, M. E., Schanz, S., ... Ferrara, N. (2007). Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nature Biotechnology*, 25(8), 911–20. doi:10.1038/nbt1323
- Shrayer, D., Bogaars, H., Hearing, V. J., Maizel, a, & Wanebo, H. (1995). Further characterization of a clinically relevant model of melanoma metastasis and an effective

- vaccine. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 40(5), 277–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600558>
- Siekmann, A. F., & Lawson, N. D. (2007). Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*, 445(February), 781–784. doi:10.1038/nature05577
- Siemann, D. W. (2011). The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treatment Reviews*, 37(1), 63–74. doi:10.1016/j.ctrv.2010.05.001
- Siemann, D. W., Bibby, M. C., Dark, G. G., Dicker, A. P., Eskens, F. A. L. M., Horsman, M. R., ... Lorusso, P. M. (2005). Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(2 Pt 1), 416–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701823>
- Siemann, D. W., & Chaplin, D. J. (2007). An update on the clinical development of drugs to disable tumor vasculature. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(10), 1357–67. doi:10.1517/17460441.2.10.1357
- Siemann, D. W., Chaplin, D. J., & Horsman, M. R. (2004). Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease. *Cancer*, 100(12), 2491–9. doi:10.1002/cncr.20299
- Siemann, D. W., & Horsman, M. R. (2009). Vascular targeted therapies in oncology. *Cell and Tissue Research*, 335(1), 241–8. doi:10.1007/s00441-008-0646-0
- Siemann, D. W., & Rojiani, A. M. (2005). The vascular disrupting agent ZD6126 shows increased antitumor efficacy and enhanced radiation response in large, advanced tumors. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 62(3), 846–53. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.02.048
- Siemann, D. W., & Shi, W. (2004). Efficacy of combined antiangiogenic and vascular disrupting agents in treatment of solid tumors. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 60(4), 1233–40. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.08.002
- Siemann, D. W., & Shi, W. (2008). Dual targeting of tumor vasculature: combining Avastin and vascular disrupting agents (CA4P or OXi4503). *Anticancer Research*, 28(4B), 2027–31. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2788501&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sikder, H., Huso, D. L., Zhang, H., Wang, B., Ryu, B., Hwang, S. T., ... Alani, R. M. (2003). Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors. *Cancer Cell*, 4(4), 291–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585356>
- Silva, E., Leitão, S., Henriques, S., Kowalewski, M. P., Hoffmann, B., Ferreira-Dias, G., ... Mateus, L. (2010). Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. *Journal of Reproductive Immunology*, 84, 66–74. doi:10.1016/j.jri.2009.10.004
- Singh, M., Couto, S. S., Forrest, W. F., Lima, A., Cheng, J. H., Molina, R., ... Johnson, L. (2012). Anti-VEGF antibody therapy does not promote metastasis in genetically engineered mouse tumor models. *J Pathol*, 227, 417–430.
- Singh, M., Murriel, C. L., & Johnson, L. (2012). Genetically engineered mouse models: Closing the gap between preclinical data and trial outcomes. *Cancer Research*, 72(11), 2695–2700. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2786
- Sinha, B. K., Dusre, L., Collins, C., & Myers, C. E. (1989). Resistance of paraquat and adriamycin in human breast tumor cells: role of free radical formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1010, 304–310. doi:10.1016/0167-4889(89)90053-0
- Sinha, B. K., Trush, M. a., Kennedy, K. a., & Mimnaugh, E. G. (1984). Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA. *Cancer Research*, 44, 2892–2896.
- Sini, P., Samarzija, I., Baffert, F., Littlewood-Evans, A., Schnell, C., Theuer, A., ... Hynes, N.

- E. (2008). Inhibition of multiple vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR) blocks lymph node metastases but inhibition of VEGFR-2 is sufficient to sensitize tumor cells to platinum-based chemotherapeutics. *Cancer Research*, 68(5), 1581–1592. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4685
- Sjölund, J., Johansson, M., Manna, S., Norin, C., Pietras, A., Beckman, S., ... Axelson, H. (2008). Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(1), 217–28. doi:10.1172/JCI32086
- Skalli, O., Pelte, M. F., Peclet, M. C., Gabbiani, G., Gugliotta, P., Bussolati, G., ... Orci, L. (1989). Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 37, 315–321. doi:10.1177/37.3.2918221
- Skubitz, K. M., Campbell, K. D., Iida, J., & Skubitz, a P. (1996). CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157, 3617–3626.
- Skuli, N., Liu, L., Runge, A., Wang, T., Yuan, L., Patel, S., ... Keith, B. (2009). Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor – 2 alfa (HIF-2alfa) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood*, 114(2), 469–477. doi:10.1182/blood-2008-12-193581.
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., & Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336(6200), 688–690. doi:10.1038/336688a0
- Smith, C. M., Finger, J. H., Hayamizu, T. F., McCright, I. J., Xu, J., Berghout, J., ... M., R. (2014). The mouse Gene Expression Database (GXD): 2014 update. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D818–D824. Retrieved from http://www.informatics.jax.org/gxdlit/summary?_Marker_key=53916
- Smith, D. A., Monk, P. N., & Partridge, L. J. (1995). Antibodies against human CD63 activate transfected rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Molecular Immunology*, 32(17-18), 1339–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8643103>
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., & Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92, 735–745. doi:10.1016/S0092-8674(00)81402-6
- Song, R. X.-D., Zhang, Z., Chen, Y., Bao, Y., & Santen, R. J. (2007). Estrogen Signaling via a Linear Pathway Involving Insulin-Like Growth Factor I Receptor, Matrix Metalloproteinases, and Epidermal Growth Factor Receptor to Activate Mitogen-Activated Protein Kinase in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology*, 148(8), 4091–4101. doi:10.1210/en.2007-0240.Estrogen
- Song, R. X.-D., McPherson, R. a, Adam, L., Bao, Y., Shupnik, M., Kumar, R., & Santen, R. J. (2002). Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Molecular Endocrinology*, 16(1), 116–127. doi:10.1210/mend.16.1.0748
- Sonoshita, M., Aoki, M., Fuwa, H., Aoki, K., Hosogi, H., Sakai, Y., ... Taketo, M. M. (2011). Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell*, 19(1), 125–37. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.008
- Soyuer, S., Soyuer, I., Unal, D., Ucar, K., Yildiz, O. G., & Orhan, O. (2010). Prognostic significance of CD9 expression in locally advanced gastric cancer treated with surgery and adjuvant chemoradiotherapy. *Pathology, Research and Practice*, 206(9), 607–10. doi:10.1016/j.prp.2010.04.004
- Sridhar, S. C., & Miranti, C. K. (2005). Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene*, 25(16), 2367–2378. doi:10.1038/sj.onc.1209269
- Starborg, M., Gell, K., Brundell, E., & Hoog, C. (1996). The murine Ki-67 cell proliferation

- antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci*, 109 (Pt 1, 143–153. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8834799>
<http://jcs.biologists.org/content/109/1/143.full.pdf>
- Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*, 12(8), 895–904. doi:10.1038/nm1469
- Stellas, D., Karameris, A., & Patsavoudi, E. (2007). Monoclonal antibody 4C5 immunostains human melanomas and inhibits melanoma cell invasion and metastasis. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(6), 1831–8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1585
- Sternberg, N., & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. *Journal of Molecular Biology*, 150(4), 603–608. doi:10.1016/0022-2836(81)90384-3
- Stewart, K. S., Zhou, Z., Zweidler-mckay, P., & Kleinerman, E. S. (2011). Delta-like ligand 4 – Notch signaling regulates bone marrow – derived pericyte / vascular smooth muscle cell formation. *Blood*, 117(2), 719–726. doi:10.1182/blood-2010-05-284869
- Stewart, T. A., Pattengale, P. K., & Leder, P. (1984). Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell*, 38(3), 627–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6488314>
- Stipp, C. S. (2010). Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12(January), e3. doi:10.1017/S1462399409001355
- Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V., & Hemler, M. E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(2), 106–12. doi:10.1016/S0968-0004(02)00014-2
- Stockmann, C., Doedens, A., Weidemann, A., Zhang, N., Takeda, N., Greenberg, J. I., ... Johnson, R. S. (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*, 456(7223), 814–8. doi:10.1038/nature07445
- St-Onge, L., Furth, P. A., & Gruss, P. (1996). Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Research*, 24(19), 3875–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146172&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Streba, C. T., Vere, C. C., Mescu, C., Gheonea, D. I., Sandulescu, L., Ciurea, T., ... Saftoiu, A. (2012). Of Mice and Ethics. *Current Health Sciences Journal*, 38(1), 1–4.
- Stringer, J. R., Larson, J. S., Fischer, J. M., Medvedovic, M., Hersh, M. N., Boivin, G. P., & Stringer, S. L. (2005). Modeling variation in tumors in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), 2408–13. doi:10.1073/pnas.0401340102
- Suchting, S., & Eichmann, A. (2009). Jagged gives endothelial tip cells an edge. *Cell*, 137(6), 988–90. doi:10.1016/j.cell.2009.05.024
- Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Bréant, C., Duarte, A., & Eichmann, A. (2007). The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3225–3230. doi:10.1073/pnas.0611177104
- Sugarbaker, E. V. (1988). The complex clinical model of metastasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 233, 405–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3223394>
- Sugden, B., Marsh, K., & Yates, J. (1985). A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. *Molecular and Cellular Biology*, 5(2), 410–413.
- Swift, M. R., & Weinstein, B. M. (2009). Arterial-venous specification during development.

- Circulation Research*, 104(5), 576–588. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.188805
- Szala, S., Kasai, Y., Steplewski, Z., Rodeck, U., Koprowski, H., & Linnenbach, A. J. (1990). Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6833–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=54632&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Takaoka, A., Hinoda, Y., Sato, S., Itoh, F., Adachi, M., Hareyama, M., & Imai, K. (1998). Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 89(4), 397–404. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9617345>
- Takayama, S. (1968). Induction of Transplantable Liver Tumors in DBF1 Mice After Oral Administration of N,N'-2,7-Fluorenylenebisacetamide. *J Natl Cancer Inst*, 40(3), 629–641. doi:10.1093/jnci/40.3.629
- Takeda, T., Hattori, N., Tokuhara, T., Nishimura, Y., Yokoyama, M., & Miyake, M. (2007). Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model. *Cancer Research*, 67(4), 1744–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3090
- Takeda, Y., Kazarov, A. R., Butterfield, C. E., Hopkins, B. D., Benjamin, L. E., Kaipainen, A., & Hemler, M. E. (2007). Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood*, 109(4), 1524–32. doi:10.1182/blood-2006-08-041970
- Takeda, Y., Li, Q., Kazarov, A. R., Epardaud, M., Elpek, K., Turley, S. J., & Hemler, M. E. (2011a). Diminished metastasis in tetraspanin CD151-knockout mice. *Blood*, 118(2), 464–72. doi:10.1182/blood-2010-08-302240
- Takeda, Y., Li, Q., Kazarov, A. R., Epardaud, M., Elpek, K., Turley, S. J., & Hemler, M. E. (2011b). Diminished metastasis in tetraspanin CD151-knockout mice. *Blood*, 118(2), 464–72. doi:10.1182/blood-2010-08-302240
- Takeda, Y., Tachibana, I., Miyado, K., Kobayashi, M., Miyazaki, T., Funakoshi, T., ... Mekada, E. (2003). Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *Journal of Cell Biology*, 161(5), 945–956. doi:10.1083/jcb.200212031
- Takino, T., Miyamori, H., Kawaguchi, N., Uekita, T., Seiki, M., & Sato, H. (2003). Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(1), 160–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12705901>
- Takizawa, Y., Saida, T., Tokuda, Y., Dohi, S., Wang, Y. L., Urano, K., ... Ueyama, Y. (1997). New immunodeficient (nude-scid, beige-scid) mice as excellent recipients of human skin grafts containing intraepidermal neoplasms. *Archives of Dermatological Research*, 289(4), 213–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143737>
- Talmadge, J. E. (2010). Models of metastasis in drug discovery. In *Mouse Models of Drug Discovery* (pp. 221–239).
- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (1982). Cancer metastasis is selective or random depending on the parent tumour population. *Nature*. doi:10.1038/297593a0
- Talmadge, J. E., Lenz, B. F., Klabansky, R., Simon, R., Riggs, C., Guo, S., ... Fidler, I. J. (1986). Therapy of autochthonous skin cancers in mice with intravenously injected liposomes containing muramyltripectide. *Cancer Research*, 46(3), 1160–1163.
- Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., & Paavonen, K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research*, 65, 550–563. doi:10.1016/j.cardiores.2004.12.002
- Tammela, T., Zarkada, G., Nurmi, H., Jakobsson, L., Tvorogov, D., Zheng, W., ... Mäkinen, T. (2012). VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. *Nat Cell Biol*, 13(10), 1202–1213. doi:10.1038/ncb2331.VEGFR-3

- Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomäki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., ... Alitalo, K. (2008). Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*, 454(July), 656–660. doi:10.1038/nature07083
- Tan, M. H., Holyoke, E. D., & Goldrosen, M. H. (1977). Murine colon adenocarcinoma: syngeneic orthotopic transplantation and subsequent hepatic metastases. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(5), 1537–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/909110>
- Taylor, K. L., Henderson, A. M., & Hughes, C. C. W. (2002). Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvascular Research*, 64, 372–383. doi:10.1006/mvre.2002.2443
- Taylor, S., & Folkman, J. (1982). Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature*, 297(5864), 307–312. doi:10.1038/297307a0
- Teicher, B. A. (2011). Antiangiogenic agents and targets: A perspective. *Biochemical Pharmacology*, 81(1), 6–12. doi:10.1016/j.bcp.2010.09.023
- Teicher, B. A., Holden, S. A., Ara, G., Sotomayor, E. A., Huang, Z. D., Chen, Y. N., & Brem, H. (1994). Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *International Journal of Cancer*, 57(6), 920–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7515861>
- The Jackson Laboratory. (2014). Why mouse genetics? *Research and resources*. Retrieved from <http://research.jax.org/mousegenetics/index.html>
- The Jackson Laboratory. (2016). Nomenclature of genetically engineered and mutant mice. *Nomenclature for mouse strains*. Retrieved April 6, 2016, from <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature/genetically-engineered-and-mutant-mice>
- Thomas, J. P., Arzoomanian, R. Z., Alberti, D., Marnocha, R., Lee, F., Friedl, A., ... Wilding, G. (2003). Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(2), 223–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525513>
- Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51(3), 503–512. doi:10.1016/0092-8674(87)90646-5
- Thomson, J. a, Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. a, Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
- Thurston, G., & Kitajewski, J. (2008). VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *British Journal of Cancer*, 99, 1204–1209. doi:10.1038/sj.bjc.6604484
- Thurston, G., Noguera-troise, I., & Yancopoulos, G. D. (2007). The Delta paradox:Dll4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, 7(May), 327–331.
- Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertrán, E., Pérez-Pomares, J. M., Díez, J., ... de la Pompa, J. L. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes & Development*, 18(1), 99–115. doi:10.1101/gad.276304
- Toi, M., Hoshina, S., Takayanagi, T., & Tominaga, T. (1994). Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Japanese Journal of Cancer Research : Gann*, 85(10), 1045–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525523>
- Tomayko, M. M., & Reynolds, C. P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 24(3), 148–154.

doi:10.1007/BF00300234

- Toneguzzo, F., Hayday, a C., & Keating, a. (1986). Electric field-mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. *Molecular and Cellular Biology*, 6(2), 703–706.
- Tong, R. T., Boucher, Y., Kozin, S. V., Winkler, F., Hicklin, D. J., & Jain, R. K. (2004). Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Research*, 64(11), 3731–6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0074
- Tonoli, H., & Barrett, J. C. (2005). CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? *Trends in Molecular Medicine*, 11(12), 563–570. doi:10.1016/j.molmed.2005.10.002
- Toothill, V. J., Van Mourik, J. A., Niewenhuis, H. K., Metzelaar, M. J., & Pearson, J. D. (1990). Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(1), 283–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1694204>
- Toulmonde, M., Demolish, P., & Houede, N. (2010). Salvage chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer: Association of Adriamycin and ifosfamide. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(6), 1005–1011. doi:10.3892/etm.2010.138
- Toya, S. P., Wary, K. K., Mittal, M., Li, F., Toth, P. T., Park, C., ... Malik, A. B. (2015). Integrin $\alpha 6 \beta 1$ Expressed in ESCs Instructs the Differentiation to Endothelial Cells. *Stem Cells*, n/a–n/a. doi:10.1002/stem.1974
- Trindade, A., Djokovic, D., Gigante, J., Badenes, M., Pedrosa, A.-R., Fernandes, A.-C., ... Duarte, A. (2012). Low-dosage inhibition of Dll4 signaling promotes wound healing by inducing functional neo-angiogenesis. *PloS One*, 7(1), e29863. doi:10.1371/journal.pone.0029863
- Trindade, A., Kumar, S. R., Scehnet, J. S., Lopes-da-Costa, L., Becker, J., Jiang, W., ... Duarte, A. (2008). Overexpression of delta-like 4 induces arterialization and attenuates vessel formation in developing mouse embryos. *Blood*, 112(5), 1720–9. doi:10.1182/blood-2007-09-112748
- Trites, J., Yoo, J., Taylor, M., Schmidt, E., Morris, V., MacDonald, I., ... Groom, A. (2000). Lymph node metastasis in malignant melanoma: an in vivo animal model. *The Journal of Otolaryngology*, 29(4), 233–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11003076>
- Tugues, S., Honjo, S., König, C., Padhan, N., Kroon, J., Gualandi, L., ... Claesson-Welsh, L. (2013). Tetraspanin CD63 promotes vascular endothelial growth factor receptor 2- $\beta 1$ integrin complex formation, thereby regulating activation and downstream signaling in endothelial cells in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 19060–19071. doi:10.1074/jbc.M113.468199
- Tur-Kaspa, R., Teicher, L., Levine, B. J., Skoultchi, a I., & Shafritz, D. a. (1986). Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 6(2), 716–718.
- Uhlén, M., Björling, E., Agaton, C., Szgyarto, C. A.-K., Amini, B., Andersen, E., ... Pontén, F. (2005). A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 4(12), 1920–32. doi:10.1074/mcp.M500279-MCP200
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., ... Ponten, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220), 1260419–1260419. doi:10.1126/science.1260419
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 1–12. doi:10.1093/nar/gks596
- Uzgare, A. R., Kaplan, P. J., & Greenberg, N. M. (2003). Differential expression and/or

- activation of p38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate*, 55, 128–139. doi:10.1002/pros.10212
- Vail, D. M., & MacEwen, E. G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investigation*, 18(8), 781–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11107448>
- Valiente, M., Obenauf, A. C., Jin, X., Chen, Q., Zhang, X. H.-F., Lee, D. J., ... Massagué, J. (2014). Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell*, 156(5), 1002–16. doi:10.1016/j.cell.2014.01.040
- Van de Veire, S., Stalmans, I., Heindryckx, F., Oura, H., Tijeras-Raballand, A., Schmidt, T., ... Carmeliet, P. (2010). Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PlGF inhibition in cancer and eye disease. *Cell*, 141(1), 178–90. doi:10.1016/j.cell.2010.02.039
- van den Brûle, F. A., Engel, J., Stetler-Stevenson, W. G., Liu, F. T., Sobel, M. E., & Castronovo, V. (1992). Genes involved in tumor invasion and metastasis are differentially modulated by estradiol and progestin in human breast-cancer cells. *International Journal of Cancer*, 52(4), 653–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1399148>
- Van der Veldt, A. a M., Lubberink, M., Bahce, I., Walraven, M., de Boer, M. P., Greuter, H. N. J. M., ... Smit, E. F. (2012). Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. *Cancer Cell*, 21(1), 82–91. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.023
- Van Dyke, T., & Jacks, T. (2002). Cancer modeling in the modern era: Progress and challenges. *Cell*, 108(2), 135–144. doi:10.1016/S0092-8674(02)00621-9
- Vandenbergh, J. G. (2000). Use of House Mice in Biomedical Research. *ILAR Journal*, 41(3), 133–135.
- Varzavand, A., Drake, J. M., Svensson, R. U., Herndon, M. E., Zhou, B., Henry, M. D., & Stipp, C. S. (2013). Integrin $\alpha\beta 1$ regulates tumor cell responses to stromal cells and can function to suppress prostate cancer metastatic colonization. *Clinical & Experimental Metastasis*, 30(4), 541–52. doi:10.1007/s10585-012-9558-1
- Vasse, M., Colin, S., Guilmain, W., Creoff, E., Muraine, M., Vannier, J.-P., & Al-Mahmood, S. (2015). Les tétraspanines : une nouvelle cible pour la thérapie anti-angiogénique ? *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 73(2), 100–107. doi:10.1016/j.pharma.2014.07.002
- Vasudev, N. S., & Reynolds, A. R. (2014). Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, 17(3), 471–94. doi:10.1007/s10456-014-9420-y
- Vaupel, P., Fortmeyer, H. P., Runkel, S., & Kallinowski, F. (1987). Blood flow, oxygen consumption, and tissue oxygenation of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Research*, 47(13), 3496–503. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3581084>
- Vaupel, P., & Hockel, M. (2000). Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance. *International Journal of Oncology*, 17(5), 869–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11029486>
- Vaupel, P., Schlenger, K., Knoop, C., & Höckel, M. (1991). Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Research*, 51(12), 3316–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2040005>
- Veenendaal, L. M., Kranenburg, O., Smakman, N., Klomp, A., Borel Rinkes, I. H. M., & van Diest, P. J. (2008). Differential Notch and TGFbeta signaling in primary colorectal tumors and their corresponding metastases. *Cellular Oncology: The Official Journal of the International Society for Cellular Oncology*, 30(1), 1–11. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4618437&tool=pmcentrez&r>

endertype=abstract

- Verheul, H. M. W., Hammers, H., Van Erp, K., Wei, Y., Sanni, T., Salumbides, B., ... Pili, R. (2007). Vascular endothelial growth factor trap blocks tumor growth, metastasis formation, and vascular leakage in an orthotopic murine renal cell cancer model. *Clinical Cancer Research*, 13(14), 4201–4208. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2553
- Verheul, H. M. W., Lolkema, M. P. J., Qian, D. Z., Hilkes, Y. H. A., Liapi, E., Akkerman, J.-W. N., ... Voest, E. E. (2007). Platelets take up the monoclonal antibody bevacizumab. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(18 Pt 1), 5341–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0847
- Vischer, U. M., & Wagner, D. D. (1993). CD63 is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*, 82(19), 1184–1191.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789–99. doi:10.1038/nm1087
- Volpert, O. V., Lawler, J., & Bouck, N. P. (1998). A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6343–6348. doi:10.1073/pnas.95.11.6343
- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K. E., Geber, A., ... Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*, 468(7325), 829–33. doi:10.1038/nature09624
- Wang, Y., Liu, Y., Malek, S. N., Zheng, P., & Liu, Y. (2011). Targeting HIF1 α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell*, 8(4), 399–411. doi:10.1016/j.stem.2011.02.006
- Wang, Z., Banerjee, S., Li, Y., Rahman, K. M. W., Zhang, Y., & Sarkar, F. H. (2006). Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 66(5), 2778–84. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4281
- Wang, Z., Li, Y., Banerjee, S., & Sarkar, F. H. (2009). Emerging role of Notch in stem cells and cancer. *Cancer Letters*, 279(1), 8–12. doi:10.1016/j.canlet.2008.09.030
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Ahmad, A., Banerjee, S., & Sarkar, F. H. (2010). Cross-talk between miRNA and Notch signaling pathways in tumor development and progression. *Cancer Letters*, 292(2), 141–8. doi:10.1016/j.canlet.2009.11.012
- Warren, C. M., & Iruela-Arispe, M. L. (2010). Signaling circuitry in vascular morphogenesis. *Current Opinion in Hematology*, 17(3), 213–8. doi:10.1097/MOH.0b013e32833865d1
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–62. doi:10.1038/nature01262
- Watnick, R. S. (2012). The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), a006676. doi:10.1101/cshperspect.a006676
- Watson, S. A., Morris, T. M., Robinson, G., Crimmin, M. J., Brown, P. D., & Hardcastle, J. D. (1995). Inhibition of organ invasion by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in two human colon carcinoma metastasis models. *Cancer Research*, 55(16), 3629–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7627972>
- Wechter, W. J., Leipold, D. D., Murray, E. D., Quiggle, D., McCracken, J. D., Barrios, R. S., & Greenberg, N. M. (2000). E-7869 (R-flurbiprofen) inhibits progression of prostate cancer in the TRAMP mouse. *Cancer Research*, 60(8), 2203–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10786685>
- Weinberg, R. A. (2014a). Dialogue Replaces Monologue: Heterotypic Interactions and the Biology of Angiogenesis. In *The Biology of Cancer* (2nd ed., pp. 577–640). Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Weinberg, R. A. (2014b). Moving Out: Invasion and Metastasis. In *The Biology of Cancer* (2nd

- ed., pp. 641–722). Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Weinberg, R. A. (2014c). The Rational Treatment of Cancer. In *The Biology of Cancer* (2nd ed., pp. 797–876). Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Weinstat-Saslow, D. L., Zabrenetzky, V. S., VanHoutte, K., Frazier, W. A., Roberts, D. D., & Steeg, P. S. (1994). Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Research*, 54(24), 6504–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7527299>
- Weinstat-Saslow, D., & Steeg, P. S. (1994). Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8(6), 401–407. Retrieved from <http://www.fasebj.org/content/8/6/401.long>
- Weis, S. M., & Cheresh, D. A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*, 17(11), 1359–1370. doi:10.1038/nm.2537
- Weiss, B., & Shannon, K. (2003). Mouse cancer models as a platform for performing preclinical therapeutic trials. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(1), 84–89. doi:10.1016/S0959-437X(02)00016-3
- Weiss, L. (2000). Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Reviews*, 19(3-4), I–XI, 193–383. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11394186>
- Welch, D. R. (1997). Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clinical & Experimental Metastasis*, 15(3), 272–306. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9174129>
- Welti, J. C., Powles, T., Foo, S., Gourlaouen, M., Preece, N., Foster, J., ... Reynolds, A. R. (2012). Contrasting effects of sunitinib within in vivo models of metastasis. *Angiogenesis*, 15(4), 623–41. doi:10.1007/s10456-012-9291-z
- Whitman, D. F., & Dunbar, S. a. (2008). Real-time polymerase chain reaction detection methods. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2, 20–26. doi:10.2174/187221508783406558
- Wildiers, H., Guetens, G., De Boeck, G., Verbeken, E., Landuyt, B., Landuyt, W., ... van Oosterom, A. T. (2003). Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. *British Journal of Cancer*, 88(12), 1979–86. doi:10.1038/sj.bjc.6601005
- Williams, C. K., Li, J. L., Murga, M., Harris, A. L., & Tosato, G. (2006). Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood*, 107(3), 931–939. doi:10.1182/blood-2005-03-1000
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. a, Stewart, C. L., Gearing, D. P., ... Gough, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336(6200), 684–687. doi:10.1038/336684a0
- Wilson, A., & Radtke, F. (2006). Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Letters*, 580(12), 2860–8. doi:10.1016/j.febslet.2006.03.024
- Wilson, W. R., & Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 11(6), 393–410. doi:10.1038/nrc3064
- Wilson, W. R., Li, A. E., Cowan, D. S., & Siim, B. G. (1998). Enhancement of tumor radiation response by the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 42(4), 905–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9845119>
- Winkler, F., Kozin, S. V., Tong, R. T., Chae, S.-S., Booth, M. F., Garkavtsev, I., ... Jain, R. K. (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell*, 6(6), 553–63. doi:10.1016/j.ccr.2004.10.011
- Wong, C. W., Lee, A., Shientag, L., Yu, J., Dong, Y., Kao, G., ... Muschel, R. J. (2001).

- Apoptosis: An Early Event in Metastatic Inefficiency. *Cancer Res.*, 61(1), 333–338. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/1/333.abstract>
- Wong, T.-K., & Neumann, E. (1982). Electric field mediated gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107(2), 584–587. doi:10.1016/0006-291X(82)91531-5
- Wood, S. A., Allen, N. D., Rossant, J., Auerbach, A., & Nagy, A. (1993). Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature*, 365(6441), 87–89. doi:10.1038/365087a0
- Wright, M. D., Geary, S. M., Fitter, S., Moseley, G. W., Lau, L.-M., Sheng, K.-C., ... Ashman, L. K. (2004). Characterization of mice lacking the tetraspanin superfamily member CD151. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), 5978–5988. doi:10.1128/MCB.24.13.5978-5988.2004
- Wu, S., Chen, J. J., Kudelka, A., Lu, J., & Zhu, X. (2008). Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Oncology*, 9(2), 117–23. doi:10.1016/S1470-2045(08)70003-2
- Wu, Y., Cain-Hom, C., Choy, L., Hagenbeek, T. J., de Leon, G. P., Chen, Y., ... Siebel, C. W. (2010). Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature*, 464(7291), 1052–7. doi:10.1038/nature08878
- www.proteinatlas.org. (2016). Melanoma - Dll4. *Cancer atlas*. Retrieved March 14, 2016, from <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000128917-DLL4/cancer/tissue/melanoma>
- Xu, D., Sharma, C., & Hemler, M. E. (2009). Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(11), 3674–81. doi:10.1096/fj.09-133462
- Xu, L., Cochran, D. M., Tong, R. T., Winkler, F., Kashiwagi, S., Jain, R. K., & Fukumura, D. (2006). Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Research*, 66(8), 3971–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3085
- Yañez-Mó, M., Barreiro, O., Gonzalo, P., Batista, A., Megías, D., Genis, L., ... Sánchez-Madrid, F. (2008). MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. *Blood*, 112(8), 3217–3226. doi:10.1182/blood-2008-02-139394
- Yan, M., Callahan, C. A., Beyer, J. C., Allamneni, K. P., Zhang, G., Ridgway, J. B., ... Plowman, G. D. (2010). Chronic DLL4 blockade induces vascular neoplasms. *Nature*, 463(7282), E6–7. doi:10.1038/nature08751
- Yañez-Mó, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdés, M., & Sánchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in Cell Biology*, 19(9), 434–46. doi:10.1016/j.tcb.2009.06.004
- Yang, J., Mani, S. A., & Weinberg, R. A. (2006). Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Research*, 66(9), 4549–4552. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3850
- Yang, J., Peng, Z., Si, S., Liu, W., Luo, Y., & Ye, Z. (2008). KAI1 gene suppresses invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells in vitro and in animal models. *Liver International*, 28(1), 132–139. doi:10.1111/j.1478-3231.2007.01620.x
- Yang, M., Baranov, E., Jiang, P., Sun, F. X., Li, X. M., Li, L., ... Hoffman, R. M. (2000). Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), 1206–11. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yang, X. H., Richardson, A. L., Torres-Arzayus, M. I., Zhou, P., Sharma, C., Kazarov, A. R., ... Hemler, M. E. (2008). CD151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling, and molecular organization. *Cancer Research*, 68(9), 3204–13.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2949

- Yang, X., Wei, L. L., Tang, C., Slack, R., Mueller, S., & Lippman, M. E. (2001). Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Research*, 61(13), 5284–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431371>
- Yeh, T.-S., Wu, C.-W., Hsu, K.-W., Liao, W.-J., Yang, M.-C., Li, A. F.-Y., ... Chi, C.-W. (2009). The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2. *Cancer Research*, 69(12), 5039–48. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4021
- Yoshiura, K., Nishishita, T., Nakaoka, T., Yamashita, N., & Yamashita, N. (2009). Inhibition of B16 melanoma growth and metastasis in C57BL mice by vaccination with a syngeneic endothelial cell line. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 28, 13. doi:10.1186/1756-9966-28-13
- Young, B. (2014). Skin. In B. Young, G. O'Dowd, & P. Woodford (Eds.), *Wheater's Functional Histology A Text and Colour Atlas* (6th ed., pp. 159–179). Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Ltd.
- Young, R. C., Ozols, R. F., & Myers, C. E. (1981). The anthracycline antineoplastic drugs. *New England Journal of Medicine*, 305(3), 139 – 153.
- Yu, J. J., Robb, V. A., Morrison, T. A., Ariazi, E. A., Karbowniczek, M., Astrinidis, A., ... Henske, E. P. (2009). Estrogen promotes the survival and pulmonary metastasis of tuberin-null cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2635–40. doi:10.1073/pnas.0810790106
- Yu, J. L., Rak, J. W., Coomber, B. L., Hicklin, D. J., & Kerbel, R. S. (2002). Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5559), 1526–8. doi:10.1126/science.1068327
- Yuan, F., Chen, Y., Dellian, M., Safabakhsh, N., Ferrara, N., & Jain, R. K. (1996). Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14765–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26210&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yuan, F., Salehi, H. a., Boucher, Y., Vasthare, U. S., Tuma, R. F., & Jain, R. K. (1994). Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Research*, 54(17), 4564–4568.
- Yue, S., Mu, W., & Zöller, M. (2013). Tspan8 and CD151 promote metastasis by distinct mechanisms. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(13), 2934–48. doi:10.1016/j.ejca.2013.03.032
- Zarkada, G., Heinolainen, K., Makinen, T., Kubota, Y., & Alitalo, K. (2015). VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201423278. doi:10.1073/pnas.1423278112
- Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N., & Böttinger, E. P. (2004). Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *The EMBO Journal*, 23(5), 1155–65. doi:10.1038/sj.emboj.7600069
- Zeidman, I. (1961). The Fate of Circulating Tumor Cells: I . Passage of Cells through Capillaries The Fate of Circulating Tumor Cells I . Passage of Cells through Capillaries *. *Cancer Research*, 21, 38–39.
- Zeng, Q., Li, S., Chepeha, D. B., Giordano, T. J., Li, J., Zhang, H., ... Wang, C.-Y. (2005). Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell*, 8(1), 13–23. doi:10.1016/j.ccr.2005.06.004
- Zent, R., Ailenberg, M., & Silverman, M. (1998). Tyrosine kinase cell signaling pathways of rat mesangial cells in 3-dimensional cultures: response to fetal bovine serum and platelet-

- derived growth factor-BB. *Experimental Cell Research*, 240(1), 134–43. doi:10.1006/excr.1998.4008
- Zetter, B. R. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual Review of Medicine*, 49(1), 407–424. doi:10.1146/annurev.med.49.1.407
- Zhang, F., Kotha, J., Jennings, L. K., & Zhang, X. a. (2009). Tetraspanins and vascular functions. *Cardiovascular Research*, 83(1), 7–15. doi:10.1093/cvr/cvp080
- Zhang, F., Michaelson, J. E., Moshiaich, S., Sachs, N., Zhao, W., Sun, Y., ... Zhang, X. a. (2011). Tetraspanin CD151 maintains vascular stability by balancing the forces of cell adhesion and cytoskeletal tension. *Blood*, 118(15), 4274–84. doi:10.1182/blood-2011-03-339531
- Zhang, J., Fukuhara, S., Sako, K., Takenouchi, T., Kitani, H., Kume, T., ... Mochizuki, N. (2011). Angiopoietin-1/Tie2 signal augments basal notch signal controlling vascular quiescence by inducing delta-like 4 expression through AKT-mediated activation of β -catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8055–8066. doi:10.1074/jbc.M110.192641
- Zhang, P., Yang, Y., Zweidler-McKay, P. a, & Hughes, D. P. M. (2008). Critical role of notch signaling in osteosarcoma invasion and metastasis. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(10), 2962–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1992
- Zhang, Z. T., Pak, J., Shapiro, E., Sun, T. T., & Wu, X. R. (1999). Urothelium-specific expression of an oncogene in transgenic mice induced the formation of carcinoma in situ and invasive transitional cell carcinoma. *Cancer Research*, 59(14), 3512–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10416618>
- Zheng, Z., & Liu, Z. (2006). CD151 Gene Delivery Activates PI3K/Akt Pathway and Promotes Neovascularization after Myocardial Infarction in Rats. *Molecular Medicine*, 12(October), 214–220. doi:10.2119/2006-00037.Zheng
- Zhong, T. P., Childs, S., Leu, J. P., & Fishman, M. C. (2001). Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature*, 414(November), 216–220. doi:10.1038/35102599
- Zhou, T., Hu, Z. H., Zhou, B., Fu, W. G., & Wang, Y. Q. (2009). B16-F10 melanoma cells and cell culture supernatant enhance angiogenesis in mouse ischemic limb. *Acta Physiologica Sinica*, 61(2), 139–145. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19377825>
- Zhou, Z., Ran, Y.-L., Hu, H., Pan, J., Li, Z.-F., Chen, L.-Z., ... Yang, Z.-H. (2008). TM4SF3 promotes esophageal carcinoma metastasis via upregulating ADAM12m expression. *Clinical & Experimental Metastasis*, 25(5), 537–548. doi:10.1007/s10585-008-9168-0
- Zhu, A. X., & Raymond, E. (2009). Early development of sunitinib in hepatocellular carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 9(1), 143–50. doi:10.1586/14737140.9.1.143
- Zhu, Z., Zheng, T., Lee, C. G., Homer, R. J., & Elias, J. A. (2002). Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13(2), 121–128. doi:10.1016/S1084-9521(02)00018-6
- Ziche, M., Maglione, D., Ribatti, D., Morbidelli, L., Lago, C. T., Battisti, M., ... Persico, M. G. (1997). Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 76(4), 517–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111514>
- Zigrino, P., Kuhn, I., Bäuerle, T., Zamek, J., Fox, J. W., Neumann, S., ... Mauch, C. (2009). Stromal expression of MMP-13 is required for melanoma invasion and metastasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129, 2686–2693. doi:10.1038/jid.2009.130
- Zijlstra, A., Lewis, J., DeGryse, B., Stuhlmann, H., & Quigley, J. P. (2008). The Inhibition of Tumor Cell Intravasation and Subsequent Metastasis via Regulation of In Vivo Tumor Cell Motility by the Tetraspanin CD151. *Cancer Cell*, 13(3), 221–234. doi:10.1016/j.ccr.2008.01.031

- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12). doi:10.1093/nar/gnh101
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., & Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 8, 59–73. doi:10.1038/nri2216
- Ziyad, S., & Iruela-Arispe, M. L. (2011). Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Genes & Cancer*, 2(12), 1085–96. doi:10.1177/1947601911432334
- Zöller, M. (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 9(1), 40–55. doi:10.1038/nrc2543
- Zuniga, R. M., Torcuator, R., Jain, R., Anderson, J., Doyle, T., Ellika, S., ... Mikkelsen, T. (2009). Efficacy, safety and patterns of response and recurrence in patients with recurrent high-grade gliomas treated with bevacizumab plus irinotecan. *Journal of Neuro-Oncology*, 91(3), 329–336. doi:10.1007/s11060-008-9718-y
- Zuo, H., Liu, Z., Liu, X., Yang, J., Liu, T., Wen, S., ... Wang, D. (2009). CD151 gene delivery after myocardial infarction promotes functional neovascularization and activates FAK signaling. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 15(October), 307–315. doi:10.2119/molmed.2009.00025
- Zuo, H., Liu, Z., Liu, X., Yang, J., Liu, T., Wen, S., ... Zhang, X. (2009). Assessment of myocardial blood perfusion improved by CD151 in a pig myocardial infarction model. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(1), 70–77. doi:10.1038/aps.2008.10

ANEXOS

ANEXO I – Soluções e tampões

ANEXO II – Meios de cultura

ANEXO III – Sequências dos oligonucleótidos iniciadores e misturas das reações de PCR em tempo real

ANEXO IV – Sequências dos oligonucleótidos iniciadores e condições das reações de PCR

ANEXO V – Sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados em reações de sequenciação

ANEXO VI – Sequências de reconhecimento das endonucleases de restrição

ANEXO I

Soluções e tampões

Avertina (anestésico)

Preparar um *stock* de avertina a 100% juntando 10 g de álcool tribromoetilico (2,2,2-*tribromoethyl alcohol*; Sigma-Aldrich®, T48402) com 10 mL de álcool tert-amil (2-Methyl-2-butanol; Sigma-Aldrich®, 240486). Homogenizar muito bem por agitação. A partir da solução *stock* a 100% preparar uma solução de trabalho a 2,5% (v/v) diluindo a solução *stock* com PBS estéril. O recipiente da solução *stock* e da solução de trabalho deverão ser protegidos da luz e armazenados a 4°C.

Solução de Tamoxifeno (10 mg/mL)

1% (p/v) tamoxifeno (Sigma-Aldrich, T5648-1G) + 10% (v/v) etanol + 89% (v/v) óleo de ricínio (Cremophor® EL, Sigma-Aldrich, C5135).

Calcular o volume final de modo a ser administrado 100 µL/animal/dia, isto é, 100 mg/animal/dia, considerando um peso vivo médio de 20 g (a dose diária recomendada de tamoxifeno é de 50 mg/Kg peso vivo).

Após pesar a quantidade de tamoxifeno necessária (de acordo com o número e peso dos animais a inocular) adicionar primeiro o etanol e homogeneizar no vortex. De seguida adicionar o óleo de ricínio e homogeneizar no vortex a baixa rotação. Sonicar sobre gelo durante 10 minutos numa potência de 45 W (Sonicador Bandelin Sonopuls HD 2070). Manter a solução a 4°C e protegida da luz. Imediatamente antes de ser administrada, aquecer a quantidade necessária por imersão em banho-maria a 37°C.

Mowiol (meio de montagem)

Hidrocolóide mucoadesivo derivado do álcool polivinílico. Estabilizador da fluorescência quando mantido no escuro a 4°C.

Adicionar 2,4 g de Mowiol® 4-88 (Calbiochem, 475904), 6 g de glicerol (Merck, 1.04095.0250), 6 mL de água bidestilada e 12 mL de Tris 0,2 M, pH8. Homogeneizar por agitação num *roller* durante 6 horas. Deixar repousar durante 2 horas. Aquecer a 50°C até dissolver. Centrifugar a 5000 xg durante 15 minutos. Aliquotar o sobrenadante e armazenar a -20°C.

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)

É um agente intercalador do ADN que marca os núcleos celulares, funcionando assim como agente de contraste e indicador da organização celular dos tecidos.

Adicionar 5 mg de DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate*, Sigma D9564) a 50 mL água bidestilada. Agitar com agitador magnético, durante 60 minutos. Filtrar por filtro de poro 0,22µm. Aliquotar e armazenar a -20°C protegido da luz. Descongelar apenas imediatamente antes de usar.

Tampão de electroforese –TAE

Este foi usado como solução base à qual se adiciona a agarose em pó para fazer o gel e como tampão de electroforese usado na tina de electroforese. A solução de trabalho (1×) é feita a partir de uma solução *stock* concentrada a 50×. Para a solução *stock* 50× adicionar 242 g de Tris-base (Sigma T-6066), 57,1 mL de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 0,5 M pH8,0 e água desionizada para um volume final de 1 L.

Tampão de amostra para eletroforese (laranja G, 6× concentrado)

Preparar uma solução stock 6× concentrada com 0,5% (p/v) de laranja G (1-Phenylazo-2-naphthol-6,8-disulfonic acid disodium salt, SIGMA, O3756), 40% de sucrose e 6 mM de EDTA em água destilada.

***1Kb+ DNA ladder*TM (Invitrogen, 10787-018)**

Consiste de 19 bandas, 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 1000 e 12000 pb. Este marcador de pesos moleculares é ideal para a determinação da concentração de fragmentos lineares de ADN em dupla cadeia pois sabe-se que a banda de 1650 pb contém 50 ng de ADN quando se aplicam 5 µL deste marcador de pesos moleculares. A partir das soluções *stock* foram feitas soluções de trabalho. Estas soluções consistiam de uma diluição 1:5 da solução stock de *ADN Ladder* (0,2 µg/µl final) em água desionizada, com 1/10 do volume final em tampão de amostra.

Figura i - Resultado de uma electroforese do marcador de pesos moleculares “*Ikb+ DNA Ladder*” num gel de agarose a 0,8%. Ao lado de cada banda estão referidos os respectivos pesos moleculares em pb.



Tampão TE (1×)

10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0.

Preparar a partir de uma solução *stock* (10×): adicionar 1,21 g de *Tris(hydroxymethyl)-aminomethane* (VWR, 1.08387.0500) e 0,34 g de EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate*, Sigma-Aldrich, E5134) a 800 mL de água estéril e homogenizar. Acertar pH a 8,0 com HCl concentrado (Sigma-Aldrich, H7020). Perfazer o volume final de 1 L com água estéril. Autoclavar para esterilizar.

Para obter a solução de trabalho (1×) (10 mM Tris + 1 mM EDTA), diluir a solução *stock* (10×) na razão de 1:10 com água estéril.

PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

Adicionar 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de NaHPO₄ e 0,24 g de KH₂PO₄ a 800 mL de água desionizada. Ajustar o pH a 7,4 com HCl e adicionar água desionizada até ao volume final de 1 L. Esterilizar autoclavando a 121°C durante 20 minutos.

Para cultura de células, após a esterilização por autoclavagem, o PBS foi filtrado (Stericup-GV, Durapore, 0,22 µm, Merck Millipore SCGVU05RE) na câmara de fluxo laminar e armazenado à temperatura ambiente.

Tampão de lise para CEEs

10 mM Tris-HCl 1M, pH 7,5, 10 mM EDTA (EthyleneDiamineTetraaceticAcid; Sigma-Aldrich, E6758), 200 mM NaCl, 1 mg/mL Proteinase K (NzyTech, MB01902), 0,5% (p/v) Sarcosyl (Sigma-Aldrich, L9150), 0,2% (p/v) SDS (Sodium Dodecyl Sulfate; Sigma-Aldrich, L3771) em água desionizada estéril (autoclavada e filtrada) e livre de nucleases.

Solução Triton X-100 a 10%

A 9 mL H₂O desionizada e filtrada (MiliQ) adicionar 1 mL de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, T8787). Homogeneizar no *roller*. Guardar a 4°C.

IPTG 100 mM

Pesar 0,1 g de IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside; Bioline, BIO-37036) e diluir em 4,196 mL de ddH₂O.

MTPBS 7,3 (1×)

150 mM NaCl + 16 mM Na₂HPO₄ + 4 mM NaH₂PO₄ em dH₂O.

Acertar pH a 7,3. Esterilizar por filtração 0,22 µm. Armazenar a 4°C.

Tampão lavagem 1 (50 mL)

50 mL MTPBS + 500 µL Triton X-100

Tampão de lavagem 2 (50 mL)

1,5 mL NaCl 5 M + 12,5 mL Tris 8,5 em H₂O

Tampão eluição (100 mL)

3 mL NaCl 5 M + 25 mL Tris 8,5 + 1,25 mL CaCl₂ 200 mM em dH₂O

Solução *stock* de ampicilina (100 mg/mL)

Preparar uma solução *stock* de ampicilina adicionando 1 g de ampicilina sódica (NZYTech Lda., MB021) a 10 mL de água destilada (Sigma-aldrich®, W4502). Dissolver por agitação num *roller* a 4°C durante 15 minutos. Esterilizar por filtração (filtro 0,22 µm; Merck Millipore, SLGV033RB) e distribuir alíquotas de 500 µL por microtubos estéreis. Armazenar a -20°C.

Solução de glicerol a 50% estéril

Diluir a solução comercial de glicerol (Sigma-aldrich®, G2025) num volume igual de água destilada e autoclavar. Abrir à chama.

Tampão de lise de bactérias (*cracking buffer*)

(0,2N NaOH, 0,5% SDS, 20% sacarose em H₂O)

Juntar 1 mL de NaOH (10N), 2,5 mL de SDS a 10% (p/v), 10 g de sacarose e perfazer o volume com H₂O destilada filtrada (MiliQ) até 50 mL. Fazer alíquotas de 1 mL e armazenar a -20 °C.

KCl 4M

Pesar 14,91 g de KCl e diluir em 50 mL de dH₂O.

Tampão de digestão de caudas

Misturar 5,9 g de NaCl, 50 mL de Tris 1M, 200 mL de EDTA a 500 mM e 100 mL de SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Merck, 1.13760.0100) a 10%. Perfazer o volume final de 1L com água estéril. Autoclavar para esterilizar. Adicionar proteinase K imediatamente antes de usar.

Protocolo de extração de ADN a partir de caudas

A cada fragmento de cauda presente num microtubo, adicionar 750 µL de uma solução composta por 730 µL de tampão de digestão de caudas e 20 µL de proteinase K (20 mg/mL; NzyTech, MB01902). Digerir incubando a 55°C durante a noite. No dia seguinte, adicionar 250 µL de NaCl (5 M) e homogeneizar por 7-10 inversões dos microtubos. De seguida centrifugar as amostras a 13000 rpm durante 20 minutos. No final da centrifugação transferir o sobrenadante por decantação cuidadosa para um microtubo limpo. Precipitar o ADN em solução adicionando 750 µL de isopropanol e homogeneizando por 7-10 inversões dos microtubos. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos, eliminar o sobrenadante por decantação e lavar o ADN precipitado por adição de 500 µL de etanol a 70% (v/v) e 7-10 inversões dos microtubos. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos, eliminar o sobrenadante

por decantação e deixar os microtubos abertos e invertidos sobre toalhas de papel durante 10 minutos para escorrer bem todo o etanol. No final desse tempo, colocar os microtubos com o ADN precipitado no fundo na vertical e manter abertos durante mais 10' para secar o precipitado de ADN. No final, adicionar 250 μ L de tampão TE e ressuspender o ADN precipitado por agitação num *vortex*.

ANEXO II

Meios de cultura

Meio de cultura para fibroblastos

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco™, 41965-039) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor (SFB; Gibco™, 16140-071) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco™, 15140-122).

Meio de cultura para células estaminais embrionárias (CEEs)

Knockout DMEM (Gibco™, 10829-018) suplementado com 15% (v/v) de soro fetal bovino (HyClone™ Embryonic Stem (ES) Cell Screened Fetal Bovine Serum (U.S), Heat Inactivated, SH30070.03EH), 1/100 de aminoácidos não-essenciais (Gibco™, 11140-035), 1/100 de L-Glutamina 200 mM (Gibco™, 25030-024), 1/100 de penicilina-estreptomicina (Gibco™, 15140-122) e 0,2% (v/v) de 2-mercaptoetanol 50 mM (Gibco™ 31350-010).

Meio de congelação para CEEs (2× concentrado)

Para cada 10 mL, juntar:

4,2 mL de meio de cultura para CEEs,

3,8 mL de soro fetal bovino (HyClone™ Embryonic Stem (ES) Cell Screened Fetal Bovine Serum (U.S), Heat Inactivated, SH30070.03EH) e

2 mL de DMSO (Hybri-Max™, Sigma-Aldrich®, D2650).

Meio Luria-Bertani (LB) líquido

Adicionar 25 g da preparação comercial *LB broth granulated* (NZYTech Lda., MB028) a 1 L água destilada filtrada (Stericup-HV, 0,45µm, Merck Millipore SCHVU11RE) e autoclavada. Ajustar o pH a 7,2 com uma solução de NaOH a 10 N (Sigma-aldrich® 72068). Esterilizar por autoclavagem (15 minutos a 121°C).

Meio LB-agar

Adicionar 40 g da preparação comercial LB-agar (NZYTech Lda., MB118) a 1 L água destilada filtrada (Stericup-HV, 0,45µm, Merck Millipore SCHVU11RE) e autoclavada. Colocar um agitador magnético e esterilizar por autoclavagem (20 minutos a 121°C).

Placas de LB agar com ampicilina

Adicionar 1 mL de solução stock de ampicilina (100 mg/mL, anexo I) a 1 L de LB-agar (para uma concentração final de 100 µg/mL) após este ter arrefecido a 55°C. Homogeneizar no agitador magnético durante 5 minutos. Distribuir, à chama, cerca de 20 mL por cada placa de Petri estéril (Sarstedt, 82.1473.001). Armazenar a 4°C e usar num prazo máximo de 30 dias.

ANEXO III

Sequências dos oligonucleótidos iniciadores e misturas das reações de PCR em tempo real

Sequências de oligonucleótidos iniciadores usados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Designação	Sequência (5' – 3')
<i>β-actina</i>	<i>beta-actin Fwd</i>	GAT CCT CAC GGA ATT CAT GG
	<i>beta-actin Rev</i>	GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA
<i>VegfA</i>	<i>VEGFA-F</i>	GGA GAG CAG AAG TCC CAT GA
	<i>VEGFA-R</i>	ACA CAG GAC GGC TTG AAG AT
<i>VegfC</i>	<i>VEGFC-F</i>	CCT GAA TCC TGG GAA ATG TG
	<i>VEGFC-R</i>	TCG CAC ACG GTC TTC TGT AA

Mistura de reação de PCR em tempo real para cada amostra e para cada gene alvo

Componente	Concentração	Volume (μL) para 3 reações	Concentração final
Power SYBR® Green PCR Master Mix®	2×	20	1×
Mistura de oligonucleótidos iniciadores para cada gene	2 μM	1,1	53,5 nM
ADNc	13,3 ng/μL	0,81	0,26 ng/μL
H ₂ O SDW	n.a.	19,2	n.a.

n.a. – não aplicável

Cada mistura de reação tem um volume final de 41,1 μL. Distribuem-se 12,5 μL para cada uma das três reações.

Mistura de reação de PCR em tempo real – controlo negativo

Componente	Concentração	Volume (μL)	Concentração final
PerfeCta SYBR Green Fast Mix, ROX	2×	6,25	1×
Mistura de oligonucleótidos iniciadores	2 μM	0,35	56 nM
H ₂ O SDW	n.a.	5,9	n.a.

n.a. – não aplicável

A mistura de reação tem um volume final de 12,5 μL. O controlo negativo de cada gene é colocado em apenas um poço da placa.

ANEXO IV

Sequências dos oligonucleótidos iniciadores e condições das reações de PCR

Sequências de oligonucleótidos iniciadores

Designação	Sequência (5' – 3')
DII4 ^{lox} 5'	GTG CTG GGA CTG TAG CCA CT
DII4 ^{lox} 3'	TGT TAG GGA TGT CGC TCT CC
Cre 313U	CCA GCT AAA CAT GCT TCA TC
Cre 6831	CGC TCG ACC AGT TTA GTT AC
Tsp18RAFWNeoV5	GAG ATG AGG AAG AGG AGA ACA GCG C
Tsp18RAFWoHA	GGA CTT CCT TGT AGG GGA GCT ACT
Tsp18RAREVoHA	CAT GCC TGG TAC CAC TGA CTG TAG
Tsp18LAFW2	TTC AGG TTC CAG GTG AGA GGT GCG
Tsp18LAREV2Neo	TGC ATC GCA TTG TCT GAG TAG GGT G
Tsp18FWNeoV5	CCT CAG AAG CCA TAG AGC CCA CCG
Tsp18RevNeoV5	ACC GCT TCC TCG TGC TTT ACG GTA
Tsp18FW2	AAC ACG TGG GAT TGA CTT CT
Tsp18RevWT2	TCC AAT TAC AAG GCT GGT C
Tsp18RevNeo2	AGG ATT GGG AAG ACA ATA GC
Tsp18loxFW	AAT CAA GCA GTG ACC TCG GA
Tsp18RevNeo2	AGG ATT GGG AAG ACA ATA GC
Tsp18RevKO2	GGA CAG TGT TCA GGT TCA GA
Tsp18loxI3FW2	CCA TAA GAT GTG CTA GTG ACG TG
Tsp18loxI3REV2	CAG TGT TGT CCA GGG CTT G
CAGCre1	GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC
CAGCre2	GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT

Condições das reações em cadeia da polimerase (PCR's)

Designação PCR	Programa	Mistura (para cada amostra)
Dll4 ^{lox}	94°C 2 min 94°C 45 s 60°C 30 s 72°C 30 s 72°C 10 min 4°C ∞ <div> ×34 </div>	H ₂ O 11,8 µL buffer (5×) 5 µL MgCl ₂ (25 mM) 2 µL dNTP's (2 mM) 2,5 µL Dll4 ^{lox} 5' (20 µM) 1,25 µL Dll4 ^{lox} 3' (20 µM) 1,25 µL GoTaq® Flexi (5 U/µL) 0,2 µL ADN 1 µL
VECad-Cre	95°C 3 min 95°C 30 s 60°C 30 s 72°C 35 s 72°C 3 min 4°C ∞ <div> ×35 </div>	H ₂ O 14,3µL Dreambuffer (10×) 2 µL dNTP's (10 mM) 0,5 µL Cre3 (10µM) 0,5 µL Cre6 (10µM) 0,5 µL DreamTaq (5 U/µL) 0,2 µL ADN 2 µL
Tsp18RA	95°C 1 min 95°C 30 s 57°C 30 s 68°C 9 min 72°C 10 min 4°C ∞ <div> ×40 </div>	H ₂ O 13,6 µL Dreambuffer (10×) 2 µL MgCl ₂ (25 mM) 0,8 µL dNTP's (10 mM) 1 µL Tsp18RAFWNeoV5 (10 µM) 0,5 µL Tsp18RAREVoHA (10 µM) 0,6 µL Tsp18RAFWoHA (10 µM) 0,3 µL DreamTaq (5U/µL) 0,2 µL ADN 1 µL
Tsp18LA	95°C 1 min 95°C 30 s 60°C 30 s 68°C 9 min 72°C 10 min 4°C ∞ <div> ×40 </div>	H ₂ O 14 µL Dreambuffer (10×) 2 µL MgCl ₂ (25 mM) 0,8 µL dNTP's (10 mM) 1 µL Tsp18LAFW2 (10 µM) 0,5 µL Tsp18LAREV2Neo (10 µM) 0,5 µL DreamTaq (5 U/µL) 0,2 µL ADN 1 µL
Tsp18Neo	94°C 1 min 95°C 30 s 60°C 30 s 72°C 1 min 72°C 5 min 4°C ∞ <div> ×35 </div>	H ₂ O 11,7 µL buffer (5×) 4 µL MgCl ₂ (25 mM) 1,6 µL dNTP's (10 mM) 0,5 µL Tsp18FWNeoV5 (10µM) 0,5 µL Tsp18RevNeoV5 (10µM) 0,5µL GoTaq® Flexi (5U/µL) 0,2µL ADN 1µL

Designação PCR	Programa	Mistura (para cada amostra)	
Tsp18F2	94°C 3 min 94°C 30 s 62°C 1 min 72°C 1 min 72°C 2 min 4°C ∞ <div style="position: relative; top: -40px; left: 150px;"> $\left. \begin{array}{l} \times 35 \end{array} \right\}$ </div>	H ₂ O buffer (5×) MgCl ₂ (25 mM) dNTP's (10 mM) Tsp18FW2 (20 μM) Tsp18RevWT2 (20 μM) Tsp18RevNeo2 (20 μM) GoTaq® Flexi (5 U/μL) ADN	5,7 μL 5 μL 1,6 μL 0,5 μL 2 μL 1 μL 1 μL 0,2 μL 1 μL
Tsp18HOMO	94°C 3 min 94°C 30 s 60°C 30 s 72°C 45 s 72°C 1 min 4°C ∞ <div style="position: relative; top: -40px; left: 150px;"> $\left. \begin{array}{l} \times 35 \end{array} \right\}$ </div>	H ₂ O buffer (5×) MgCl ₂ (25 mM) dNTP's (10 mM) Tsp18loxFW (10 μM) Tsp18RevNeo2 (10 μM) Tsp18RevKO2 (10 μM) GoTaq (5U/μL) ADN	8,7 μL 4 μL 1,6 μL 0,5 μL 2 μL 1 μL 1 μL 0,2 μL 1 μL
Tsp18LoxI3	94°C 3 min 94°C 30 s 60°C 30 s 72°C 1 min 72°C 2 min 4°C ∞ <div style="position: relative; top: -40px; left: 150px;"> $\left. \begin{array}{l} \times 35 \end{array} \right\}$ </div>	H ₂ O buffer (5×) MgCl ₂ (25 mM) dNTP's (10 mM) Tsp18loxI3FW2 (10 μM) Tsp18loxI3REV2 (10 μM) GoTaq (5U/μL) ADN	14,8 μL 5 μL 2,5 μL 0,5 μL 0,5 μL 0,5 μL 0,2 μL 1 μL
Tsp18LA3	95°C 3 min 95°C 45 s 63°C 45 s 72°C 3,5 min 72°C 10 min 4°C ∞ <div style="position: relative; top: -40px; left: 150px;"> $\left. \begin{array}{l} \times 35 \end{array} \right\}$ </div>	H ₂ O Dreambuffer (10×) MgCl ₂ (25 mM) dNTP's (10 mM) Tsp18loxI3FW2 (10 μM) Tsp18REVNeoV5 (10 μM) DreamTaq (5 U/μL) ADN	17 μL 2,5 μL 1 μL 1 μL 0,5 μL 0,5 μL 0,2 μL 2 μL
CAG-Cre	94°C 3 min 94°C 30 s 51,7°C 30 s 72°C 1 min 72°C 2 min 4°C ∞ <div style="position: relative; top: -40px; left: 150px;"> $\left. \begin{array}{l} \times 35 \end{array} \right\}$ </div>	H ₂ O Dreambuffer (10×) dNTP's (10 mM) CAGCre1 (20 μM) (10 μM) CAGCre2 (20 μM) GoTaq® Flexi (5 U/μL) ADN	11,3 μL 2 μL 0,5 μL 1 μL 1 μL 0,2 μL 4 μL

Dreambuffer 10×: inclui 2 mM MgCl₂; Fermentas, EP0702

DreamTaq: DNA polimerase, Fermentas, EP0702

GoTaq: DNA polimerase GoTaq® Flexi, Promega®, M829B

Buffer 5×: Green GoTaq® Flexi Buffer, Promega®, M891A

dNTPs: dNTP's mix, Promega®, U1515; MgCl₂: Promega®, A351

ANEXO V

Sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados em reações de sequenciação

Designação	Sequência (5' – 3')
M13FW	GTT TTC CCA GTC ACG AC
M13REV	CAG GAA ACA GCT ATG AC
I3 prelox	CTA CAT GGC ATG GTC ACT GG
I3 pree4	CCA TCT GGT CTC ACC CAG TT
I4 prelox2	CAC CCT CAA TCA AGC AGT GA
Neo	CCA GAG GCC ACT TGT GTA GC
Tsp18LAFW2	TTC AGG TTC CAG GTG AGA GGT GCG
Tsp18LAFW3	ACT GAT CAT TTC AGT TCT CCG
Tsp18LAFW4	ACT CTT GAT CCC AGC TCC ATA G
Tsp18LAFW5	CTA TGT GTC TTT CCT TGC GGT C
Tsp18LAFW6	GCA GAC CAG AGA ACT CTG C
Tsp18LAREV2Neo	TGC ATC GCA TTG TCT GAG TAG GGT G
2.7FW2	GTT CAA AAC ACT GGC CCC TA
2.7FW3	GGT CTC ACC CAG TTG CAG AT
2.7FW4	ATT GAC TTC TGG CCT CCA CA

ANEXO VI

Sequências de reconhecimento das endonucleases de restrição

Designação	Local de reconhecimento
<i>BglII</i>	$ \begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots \text{A G A T C T} \dots 3' \\ 3' \dots \text{T C T A G A} \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array} $
<i>ClaI</i>	$ \begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots \text{A T C G A T} \dots 3' \\ 3' \dots \text{T A G C T A} \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array} $
<i>EcoRI</i>	$ \begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots \text{G A A T T C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C T T A A G} \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array} $
<i>NotI</i>	$ \begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots \text{G C G G C C G C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C G C C G G C G} \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array} $
<i>SacII</i>	$ \begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots \text{C C G C G G} \dots 3' \\ 3' \dots \text{G G C G C C} \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array} $
<i>SalI</i>	$ \begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots \text{G T C G A C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C A G C T G} \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array} $
<i>SpeI</i>	$ \begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots \text{A C T A G T} \dots 3' \\ 3' \dots \text{T G A T C A} \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array} $
<i>XhoI</i>	$ \begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots \text{C T C G A G} \dots 3' \\ 3' \dots \text{G A G C T C} \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array} $